Omaggio degli AA.

I FONDAMENTI DOTTRINALI DELLA COLORAZIONE ISTOLOGICA.

Rassegna sintetica.

DOTT. A. M. LUZZATTO, DOCENTE NELL'UNIVERSITÀ DI PADOVA.
MEDICO PRIMARIO DELL'OSPEDALE DI FERRARA.

DOTT. FERRUCCIO RAVENNA, DOCENTE ED AIUTO NELL'UNIVERSITÀ DI PARMA.

Estratto dallo Sperimentale (Archivio di Biologia normale e patologica)
ANNO LXVII - FASC. V — SETTEMBRE-OTTOBRE 1913.

I FONDAMENTI DOTTRINALI

DELLA COLORAZIONE ISTOLOGICA.

Rassegna sintetica.

DOTT. A. M. LUZZATTO, DOCENTE NELL'UNIVERSITÀ DI PADOVA.

MEDICO PRIMARIO DELL'OSPEDALE DI FERRARA.

DOTT. FERRUCCIO RAVENNA, DOCENTE ED AIUTO NELL'UNIVERSITÀ DI PARMA.

Estratto dallo Sperimentale (Archivio di Biologia normale e patologica)

ANNO LXVII - FASC. V - SETTEMBRE-OTTOBRE 1913.

I FONDAMENTI DOTTRINALI DELLA COLORAZIONE ISTOLOGICA.

Rassegna sintetica.

DOTT. A. M. LUZZATTO, DOCENTE NELL'UNIVERSITÀ DI PADOVA.
MEDICO PRIMARIO DELL'OSPEDALE DI FERRARA.

DOTT. FERRUCCIO RAVENNA, DOCENTE ED AIUTO NELL'UNIVERSITÀ DI PARMA.

La parola *colore* in senso chimico non ha precisamente lo stesso significato che le viene attribuito nel linguaggio comune. Abitualmente si denomina *sostanza colorante* qualunque materiale atto a tingere altri corpi; è perciò indifferente se la sostanza da colorare sia capace di attirare spontaneamente su di sè il colore, togliendolo alle sue soluzioni, o se si tratti semplicemente di una sospensione della sostanza colorata che si porta sulla superficie del corpo da tingersi e che vi si lascia seccare. Perciò nel linguaggio comune sono sostanze coloranti tanto i colori di anilina quanto le vernici. Invece il chimico chiama sostanza colorante soltanto quella che il corpo da colorare attira su di sè per un processo di affinità chimica o molecolare dalle soluzioni del colore stesso; ciò può avvenire sia direttamente, sia per mezzo di una terza sostanza che prende il nome di *mordente*.

Molte sostanze inorganiche sono colorate, ma non per questo sono capaci di colorare altri oggetti e sopratutto la materia organica, in senso chimico. Oggi noi sappiamo che le sostanze coloranti propriamente dette, sia quelle adoperate nell' industria, sia quelle che si usano nella tecnica istologica, appartengono tutte ai

composti organici, ed anzi esclusivamente a quelli delle sostanze aromatiche.

Ogni colore deve dunque contenere nel suo complesso molecolare almeno un nucleo benzolico.

La seconda condizione alla quale deve adempiere una sostanza per poter essere colorante, si è che nel suo complesso sia contenuto un gruppo atomico il quale prende il nome di *gruppo cromoforo*, e che conferisce alla sostanza il potere colorante.

Questi gruppi sono in numero limitato, e più precisamente i seguenti :

1.° il *gruppo nitrico* NO_2 nel quale l'*atomo di azoto* è *pentavalente*, per cui il gruppo ha solo una valenza libera.

2.° il *gruppo nitroso* in cui l'azoto è trivalente; NO.

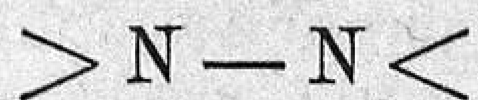
3.° l'*azogruppo* $N = N$ il quale consiste di due atomi di azoto trivalente uniti tra loro con doppio legame. Ognuna delle due valenze libere deve essere unita ad un gruppo benzolico; se da un lato vi è il nucleo benzolico, dall'altro un altro gruppo qualunque, si parla invece di *diazogruppo* (non colorato).

4.° il gruppo $C = C$, purchè almeno uno dei due atomi di carbonio faccia parte di un anello benzolico.

5.° il gruppo $C = N$, purchè l'atomo di carbonio faccia parte di un anello benzolico.

6.° il gruppo $C = O$ (*carbonile*) in cui pure il C deve far parte di un anello benzolico.

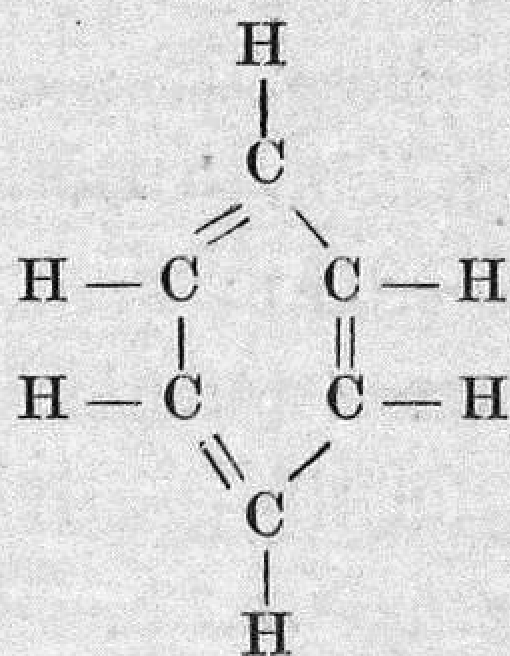
7.° l' *azingruppo.*



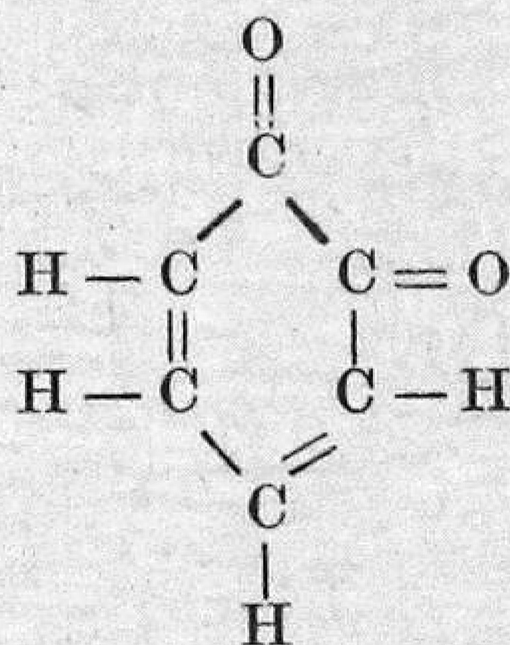
il quale si distingue dall'azogruppo per una diversa disposizione dei legami.

Questi complessi atomici apparentemente senza alcuna affinità tra loro si caratterizzano per il fatto che tutti, quando entrano a far parte di un anello benzolico, dànno luogo alla cosidetta struttura *chinonica*, e, cioè la loro presenza fa sì che due degli atomi di carbonio vengano legati ad altri atomi con doppia valenza. Contemporaneamente si sciolgono due dei doppi legami che colle-

gano fra loro gli atomi di carbonio nel benzolo. Per esempio, considerando scritto a questo modo l'anello benzolico



noi potremo scrivere così la combinazione in cui due degli atomi di idrogeno sono sostituiti da due di ossigeno



Ortochinone.

È indifferente che i due atomi da sostituire sieno in posizione *orto* od in posizione *para*.

Possiamo dunque dire che un corpo è colorato non solo perchè esso contiene uno dei gruppi cromofori già citati, ma perchè esso è costituito secondo il tipo chinonico, e tutte le sostanze costituite secondo il tipo chinonico contengono uno di questi gruppi.

Non ogni corpo colorato possiede però la proprietà di colorarne altri; per es. il chinone, l'azobenzolo, l'antrachinone, il bleu d'indaco sono corpi fortemente colorati, senza però che sia possibile che le loro soluzioni colorino un tessuto. Le proprietà coloranti vengono conferite ad una sostanza colorata dall'aggiunta di un gruppo salificabile (*gruppo aptoforo*) il quale può essere acido o basico. Una sostanza colorata che contenga solo il gruppo cromoforo e non il gruppo aptoforo si chiama *cromogeno*.

Il gruppo salificabile conferisce a tutta la sostanza colorante il carattere di un acido o di una base di modo che questo corpo

è capace di formare composti salini rispettivamente con basi o con acidi. Questi gruppi si possono dividere nelle seguenti categorie:

A — Gruppi acidi (elettronegativi)

1) *gruppo idrossilico* (OH);
2) *gruppo carbossilico* (COOH);
3) *gruppo nitrico* (NO_2);
4) *gruppo solfoacido* (sulfonico) ($HSO_3 = SO_2\,OH$).

B — Gruppi basici (elettropositivi)

1° *gruppo amidico* (NH_2)

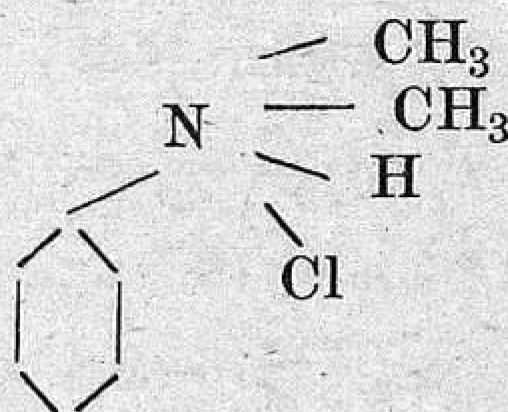
coi suoi omologhi { monometilamidico ($NH\,CH_3$) e dimetilamidico $N\,(CH_3)_2$

2° *gruppo imidico* bivalente (NH).

Questi gruppi sono caratterizzati dalla proprietà dell'azoto di diventare da trivalente a pentavalente.

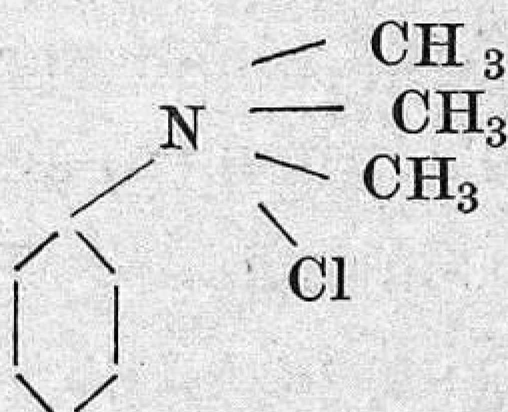
Il gruppo dimetilamidico ha la proprietà di formare due diversi tipi di sali. Per es.:

a)



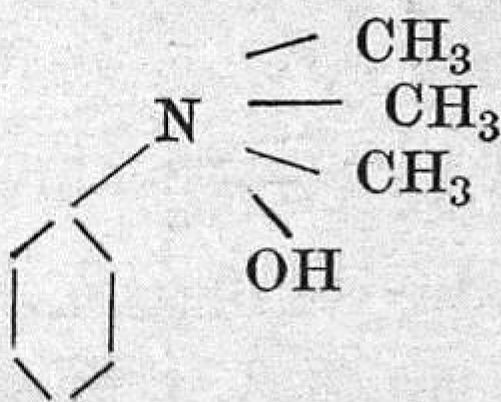
derivante dall'anilina combinata ad acido cloridrico.

b)



derivante dall'anilina combinata con cloruro di metile (CH_3Cl).

Dal sale *b* si può far derivare una base nella quale l'azoto non è mai legato direttamente con l' idrogeno



Questa si chiama *base quaternaria d'ammonio:* essa si distingue per una basicità molto più forte di quelle delle basi amidiche. Infatti queste ultime possono venire messe in libertà dai loro sali per azione di Na OH; ciò invece non avviene per le basi d'ammonio.

Noi denominiamo colori acidi non solo il colore acido stesso (*Farbsäure*), ma anche i suoi sali. Così pure sono colori basici tanto le basi coloranti (*Farbbase*) quanto i loro sali. Per es. sono colori acidi tanto l'acido picrico libero, quanto il picrato di sodio. È dunque indifferente per la denominazione di colore acido o basico come esso reagisca di fronte agli indicatori. Oltre a tutto solo per pochi colori molto chiari si può stabilire come reagiscono di fronte al tornasole, perchè la massima parte degli altri colorano fortemente l' indicatore stesso, mascherandone così l'eventuale mutamento di colore.

La ricerca della basicità ed acidità di un colore si può invece eseguire col metodo seguente: trattando la soluzione acquosa di un colore con soluzione acquosa satura di acido picrico o di acido tannico la formazione di un precipitato significa che si tratta di un colore basico; se invece la soluzione resta limpida, vuol dire che ci troviamo in presenza di un colore acido.

La maggior parte dei colori possiede non soltanto uno, ma vari gruppi salificabili. Perciò quasi tutte le basi coloranti formano sali non solo *monoacidi*, ma anche *di-* e *triacidi*. Però solamente i sali monoacidi sono stabili; i sali *di-* e *triacidi* si formano solo in un eccesso di acido minerale e si dissociano in sale monoacido ed acido libero per semplice diluizione con acqua.

I sali di- e triacidi sono sempre colorati con tinta diversa da quella dei monoacidi. Invece i colori acidi i quali possiedono vari gruppi salificabili (uno principale e vari secondari) possono formare cogli alcali combinazioni saline stabili per ognuno di questi gruppi. Quanto più fortemente un colore è salificabile, tanto maggiore è il suo potere colorante: perciò i colori con parecchi gruppi aptofori nella loro molecola sono più energici di quelli con un gruppo unico.

In genere il secondo o il terzo gruppo salificabile ha poca tendenza ad essere salificato, invece esso aumenta l'acidità o basicità del colore e per conseguenza il suo potere colorante.

Perciò questi gruppi si chiamano anche *auxocromi*.

Le basi coloranti sono tutte di un'unica forma, ossia tutti i colori basici a qualunque classe appartengano sono sempre e soltanto prodotti amidati ossia amine: gli aptofori basici sono sempre gruppi amidici i quali col loro ingresso nella molecola trasformano il cromogeno in una sostanza colorante basica. I colori basici sono adunque cloruri, solfati, acetati o nitrati di queste amine basiche colorate.

Gli H del gruppo amidico possono essere sostituiti ed il gruppo può venire alchilizzato, fenilizzato, acetilizzato o ne può essere diminuita in altro modo la basicità libera. Se in una base si sostituisce tutto il gruppo amidico coll'idrossile ne risultano i *colori acidi primari* o *fenoli coloranti*. Trattando invece le basi coloranti od i fenoli a caldo con acido nitrico o solforico, le basi vengono *nitrate* o *solforate*, non nei gruppi laterali, ma nello stesso nucleo benzolico o naftalinico, di modo che una parte del radicale nitrico o solforico entra nella molecola stessa. L'ingresso nella molecola di un solo gruppo sulfonico basta per togliere la basicità anche alle basi più forti.

Questi colori prendono il nome di *sostanze coloranti acide secondarie*.

Mentre vi è un solo tipo di basi coloranti vi sono invece quattro tipi di acidi coloranti e cioè:

1° fenoli (acidi primari);
2° solfoacidi (acidi secondari);
3° nitroacidi » »
4° acidi carbonici » »

Se in un cromogeno si trovano vari gruppi aptofori i quali siano di segno elettrico diverso (e cioè gli uni basici e gli altri acidi) la natura del colore viene determinata dalla prevalenza dell'uno o dell'altro gruppo. Se i gruppi acidi e basici sono in qualche modo in equilibrio tra loro, il colore ha contemporaneamente proprietà acide e basiche e si chiama *amfotero*.

Unendo la soluzione acquosa di un colore acido con quella di un colore basico, ne precipita di regola un corpo il quale risulta dalla combinazione dell'acido colorante con la base colorante e che prende il nome di *colore neutro*.

Per es. unendo il picrato di sodio al cloruro della basè del bleu di metilene, precipita il picrato della base del bleu di metilene. I colori neutri sono poco o punto solubili, di più in un eccesso del colore acido o basico.

Noi non possiamo qui riassumere i vari tipi di sostanza colorante a seconda della loro costituzione chimica, giacchè questo ci porterebbe troppo lontano dal nostro argomento. Ci limiteremo ad enumerare soltanto i gruppi principali:

1.° Colori derivanti dall'*acido nitrico* (acido picrico, aurantia).

2.° Colori contenenti l'*azogruppo* (Bruno di Bismarck, Tropeolina, Orange, Sudan III).

3.° *Indamine* ed indofenoli.

4.° *Tiazine* (Bleu di metilene -Tionina).

5.° *Oxazine* (Cresylvioletto).

6.° *Azine* (Rosso neutro).

7.° *Basi di azonio* (Safranina).

8.° *Gruppo del difenilmetano* (Pironina).

9.° *Gruppo del trifenilmetano* (Fucsine).

10.° *Gruppo della chinolina.*

11.° *Ossichinoni* (Bleu di alizarina).

12.° *Colori di indaco.*

A queste sostanze coloranti, di composizione chimica ben determinata dobbiamo aggiungerne due la cui struttura chimica non è ben nota e che possono colorare soltanto per mezzo di mordenti. Queste sostanze coloranti, tra le più usate nella tecnica istologica, sono il carminio e l'ematossilina.

Nella esposizione della dottrina della colorazione istologica noi dobbiamo distinguere nettamente tra la colorazione *vitale* o *sopravitale* da un lato e quella dei tessuti *fissati* dall'altro.

Noi eseguiamo la colorazione vitale *sensu strictiori* quando la sostanza colorante viene posta a contatto dei tessuti nell'organismo vivente. Ciò avviene allorchè si iniettino in circolo sostanze coloranti adatte o quando si facciano vivere animali inferiori acquatici in un mezzo opportunamente colorato, o quando infine si alimentino gli animali con sostanze coloranti.

Si ha invece la colorazione sopra-vitale allorchè frammenti

di tessuto tolti il più rapidamente possibile all'organismo vivente vengano posti immediatamente a contatto con la sostanza colorante. In tal caso si possono avere dei risultati particolari molto diversi da quello che si ottengono colorando lo stesso oggetto fissato.

Per *fissazione* noi intendiamo quel processo fisico o chimico per cui viene tolta agli albuminoidi dei tessuti la loro proprietà di sciogliersi o di rigonfiarsi nell'acqua ; questo processo permette di conservare la struttura morfologica degli elementi per un tempo lunghissimo, indefinito : mentre gli elementi dei tessuti abbandonati a se stessi, anche se in mezzo asettico, finiscono per alterarsi e disgregarsi in seguito a processi di autolisi.

La fissazione si può ottenere in modi diversi e cioè, come già dicemmo, per mezzo di agenti *fisici* e *chimici*. Appartengono ai primi la fissazione al calore secco dei preparati per strisciamento, la fissazione in acqua bollente dei pezzi d'organo. In modo analogo agisce anche l'acool, il quale coagula semplicemente l'albumina senza entrare in combinazione chimica con essa.

Invece la fissazione in formalina determina già modificazioni chimiche in quanto essa trasforma le sostanze proteiche nelle corrispondenti combinazioni di metilene; ancora più attive in senso chimico sono le fissazioni coi sali dei metalli pesanti (sublimato) i quali dànno luogo a composti albumino-metallici, e con quelle gli acidi che precipitano in modo specifico l'albumina (acido cromico).

Gli oggetti fissati si comportano di fronte ai colori in modo molto diverso dai non fissati : mentre il nucleo delle cellule viventi non manifesta alcuna affinità per le sostanze coloranti, invece i nuclei delle cellule fissate presentano in grado altissimo tale affinità.

Nel processo della colorazione dei tessuti fissati che è quello di cui dobbiamo anzitutto occuparci, l'istologo può prefiggersi due fini nettamente distinti : a seconda dello scopo che egli si propone la colorazione può essere volta a mettere in evidenza o addirittura a fare scoprire alcuni particolari od alcuni elementi morfologici altrimenti poco o punto apprezzabili ; oppure può essere scopo precipuo dell'osservatore quello di studiare il comportamento microchimico di alcune parti già morfologicamente bene distinte dell'elemento cellulare stesso. In altri termini nel primo caso la

colorazione serve unicamente a scopo descrittivo, morfologico, prescindendo dalla natura e dalle affinità chimiche del substrato che si studia; nel secondo caso invece si eseguisce per quanto è possibile, una vera analisi microchimica.

Quando l' istologo intende di studiare la struttura dei tessuti, qualunque metodo di fissazione è ottimo, purchè conduca allo scopo desiderato di dimostrazione morfologica; perciò è assolutamente indifferente se invece dell'alcool o del calore si usano come fissativi l'acido osmico o l'acido cromico i quali alterano profondamente le reazioni chimiche dei tessuti; invece quando si voglia indagare il comportamento microchimico dei tessuti stessi è assolutamente indispensabile di usare quei fissativi (alcool, calore), i quali non alterano le affinità chimiche naturali degli albuminoidi.

Come abbiamo già visto, i colori di anilina vengono generalmente usati in istologia sotto forma di sali i quali sono più attivi che non le corrispondenti basi ed acidi liberi, allo stesso modo con cui sono più attivi in farmacologia i sali degli alcaloidi. Ciò probabilmente perchè essi vengono dissociati nel loro menstruo acquoso e perciò agiscono in qualche modo allo stato nascente.

Un *colore basico* è un sale colorante che deriva dalla combinazione di una base con un acido indifferente dal punto di vista della colorazione. Invece la combinazione salina di un acido colorante con un alcali si chiama *colore acido.* La basicità o l'acidità di un colore non dipende dalla natura del gruppo cromoforo, ma da quella dei gruppi aptofori acidi o basici che si combinano col cromogeno. Essi sono quelli che dànno luogo alla combinazione chimica e conferiscono al nucleo colorante propriamente detto un carattere chimico attivo, dimodochè esso diviene adatto a combinarsi col substrato colorabile. Il colore acido o basico si attacca per mezzo di queste catene laterali acide o basiche tanto con basi o con acidi (ed allora forma i sali coloranti), quanto con i gruppi amidici o acidi della molecola albuminoide dando luogo così alla colorazione istologica.

Concludendo la colorazione istologica in senso chimico avviene per il seguente processo: il sale colorante in soluzione acquosa viene dissociato nei suoi ioni sotto l' influenza della sostanza albuminoide amfotera, ma con prevalenza ora dei gruppi acidi ora dei gruppi

basici; allora il tessuto si combina per mezzo dei suoi gruppi aptofori prevalenti collo ione di segno opposto; in altre parole la base o l'acido indifferente (dal punto di vista della colorazione) del sale colorante vengono sostituiti dalla base o dall'acido del tessuto; si forma così una combinazione salina colorata composta:

a) di albumina acida basofila (nucleina) e da base colorante;

b) di albumina basica ossifila (istone) e da acido colorante.

Ne viene che una sostanza colorante è tanto più attiva e la colorazione tanto più stabile (*echt*) quanto maggiore è il numero dei gruppi aptofori di segno uguale.

Contemporaneamente la *nuance* del colore diviene più oscura con l'aumento dei gruppi atomici che entrano a far parte della molecola e cioè con l'ingrandimento delle molecole stesse e con la diminuzione contemporanea della sua solubilità fisica.

I colori con pochi gruppi atomici hanno una molecola piccola e son perciò di tinta molto chiara, molto diffusibili, solubili nell'acqua, quindi instabili in senso chimico e fisico.

I colori con molti gruppi atomici ma di segno chimico opposto hanno molecola relativamente grande ed oscura e sono perciò stabili fisicamente e non chimicamente (neutralizzazione delle affinità chimiche): questi si chiamano anche *colori amfoteri*.

Come è noto, i colori basici tingono elettivamente il nucleo, i colori acidi, il protoplasma, e ciò per la presenza di una sostanza acidofida (acido nucleinico) nel nucleo, e di una sostanza basofila nel protoplasma. Però deve notarsi che tutte le parti della cellula si possono tingere con un solo colore sia esso acido o basico: ma la colorazione non avviene in modo elettivo: inoltre certe sostanze, come per esempio il verde di metile e l'indulina, sono capaci di fissarsi soltanto sopra alcune parti della cellula. Lo scopo principale della colorazione è quello di differenziare in modo evidente certe parti della cellula da altre. Le singole unità morfologiche si possono differenziare in quanto esse vengono colorate da sole od in quanto si tingono più intensamente o con *nuance* differente dalle altre.

A tale scopo avviene spesso di usare miscele di sostanze coloranti opportunamente scelte. Per es. noi possiamo differenziare facilmente i nuclei dei leucociti dai gonococchi con un miscuglio di

pironina e verde di metile che tinge in verde i nuclei ed in rosso i cocchi; la stessa colorazione permette di differenziare la sostanza basofila del protoplasma dei linfociti, che si tinge in rosso, da quella dei nuclei che si tinge in verde; usando di una miscela di due colori acidi, uno dei quali deve essere il Bordeaux, oppure l'Anilinblau, si ottengono colorati i centrosomi ed i fusi cellulari con tinta diversa da quella di ogni altra sostanza ossifila. Queste differenziazioni derivano soltanto da speciali proprietà del colore e non ci dicono nulla riguardo al comportamento fisico-chimico del substrato.

È questione tuttora discussa in qual modo debba venire interpretato il processo fondamentale della colorazione dei tessuti; non diciamo della *colorazione istologica* in senso ristretto, giacchè molti dei fatti che si osservano nella tecnica istologica sono con poche o punte modificazioni perfettamente analoghi a quelli che si verificano nella tintura delle fibre animali o vegetali a scopo industriale.

I dubbi vertono tutti sopra un punto fondamentale e cioè se si tratti di un fatto fisico o di un fatto chimico.

Nel primo caso la colorazione dipenderebbe esclusivamente da attrazione molecolare o da assorbimento superficiale. L'assunzione di un colore per parte di un substrato colorabile si potrebbe paragonare alla decolorazione di una soluzione colorante per mezzo di un filtro di carbone animale; l'elettività che si nota nei miscugli coloranti dipenderebbe esclusivamente dai rapporti tra la maggiore o minore porosità del substrato e la maggiore o minore grandezza delle molecole del colore.

Invece, secondo la dottrina chimica, alla quale abbiamo già più volte accennato, la colorazione avverrebbe per la combinazione dei gruppi acidi o basici del colore, con altrettanti gruppi rispettivamente basici od acidi del substrato.

Oggi tra queste due tendenze, di cui la prima è rappresentata dal *Witte* e dall'*Auerbach*, la seconda soprattutto dall' *Ehrlich* e da *Martin Heidenhain*, va facendosi strada una tendenza intermedia di cui sono rappresentanti *Pappenheim* e *Michaelis.* Secondo tale dottrina si può ammettere che nel processo della colorazione abbiano luogo fatti fisici e chimici insieme, di modo che non si tratterebbe

di semplice attrazione meccanica, ma nemmeno di affinità chimica in senso proprio, secondo la legge delle proporzioni definite e delle proporzioni multiple. È noto che vi sono fatti i quali parlano più per la dottrina chimica, mentre altri deporrebbero in favore della dottrina fisica. Ad esempio sarebbero argomenti in favore della prima i seguenti:

1.° La colorazione non avviene con ogni soluzione acquosa colorata, ma solo con sostanze le quali contengono gruppi aptofori basici od acidi a carattere chimico ben definito, e la colorazione diviene tanto più stabile ed intensa quanto maggiore è il numero dei gruppi salificabili.

2.° Se fosse vera la teoria fisica tutti i substrati sarebbero colorabili con tutti i colori a seconda dell'ampiezza dei loro spazi intermicellari; ma con ciò non si spiegherebbero le colorazioni specifiche della nucleina e delle granulazioni acidofile e basofile, le quali tra due colori di ugual grandezza molecolare, ma di segno elettrochimico diverso, scelgono rispettivamente solo il colore acido o solo il basico. Per es. le granulazioni acidofile si colorano solo con la fucsina acida e non con la basica e le granulazioni delle Mastzellen solo col metilvioletto, non col violetto acido.

3.° I nuclei morti, ma non fissati assumono pure soltanto i colori basici, mai gli acidi, per quanto possa trattarsi di colori oscuri ed a grande volume molecolare.

4.° Le catene laterali dei colori dànno luogo per lo più alla loro combinazione coi ricettori ipotetici dei tessuti. Per es. il gruppo etilico ha una particolare affinità per il sistema nervoso, che si manifesta tanto nell'azione tossica dell'alcool sul sistema nervoso e nell'azione ipnotica di molti medicamenti, quanto nelle colorazioni vitali del sistema nervoso col Methylenblau.

5.° Il gruppo sulfonico e carbossilico dei colori acidi differiscono completamente tra loro per quel che riguarda la colorazione coi mordenti, ma hanno in comune la proprietà di non presentare alcuna affinità per il sistema nervoso nella colorazione vitale.

6.° Parlano per la dottrina chimica anche i fatti che si osservano nelle colorazioni metacromatiche. In tali casi si può notare con semplici esperimenti eseguibili *in vitro* come i colori atti a

dare metacromasia sieno influenzati chimicamente da certe sostanze. Può avvenire per esempio che un substrato (*Gewebsäure*), tessuto a reazione acida si unisca sotto forma salina con la base di un colore basico metacromatico, essendo contemporaneamente presente alla reazione alcali libero. Allora ne viene influenzata la *nuance* del colore già formatosi, purchè però questi gruppi alcalini liberi non siano abbastanza forti per distruggere la combinazione chimica già costituitasi.

7.° La trasformazione di una sostanza incolora in colorata quando essa imbeve il substrato da colorarsi, per es. la rosanilina, incolora in soluzione, tinge in rosso la lana per combinazione della base incolore coi gruppi acidi delle fibre di tessuto, e per conseguenza con formazione di fucsina colorata.

Che qui si tratti di un processo chimico può essere dimostrato in modo indubbio anche da questa esperienza: colorando della lana con una quantità esattamente pesata di fucsina fino a decolorazione del mezzo colorante, nelle acque madri decolorate si ritrova esattissimamente tutta la quantità di acido cloridrico che era contenuto nella fucsina, combinato coll'ammoniaca e forse ad altri prodotti di decomposizione della fibra. Oltre a ciò la seta o la lana colorate intensamente con la fucsina non si lasciano poi decolorare completamente dalle sostanze estraenti ad azione puramente fisica (alcool, anilina).

8.° Si possono dare interpretazioni chimiche anche alle così dette colorazioni a sviluppo (*Entwicklungsfärbungen*) come quelle che si hanno coll' indaco e col bleu indofenolico.

In tali casi si imbeve la fibra con indaco bianco e lo si trasforma in indaco azzurro per un semplice processo di ossidazione. Viceversa vi sono anche colori che non si lasciano più modificare nelle loro reazioni chimiche dopo essere stati fissati sul tessuto. Per es. l' indofenolvioletto quando sia stato assorbito e fissato dal tessuto non può essere più ridotto ad indaco bianco.

9.° Il fatto che il verde di metile colora soltanto certi substrati si può spiegare facilmente con la mancanza in tutti gli altri del grado di acidità necessaria affinchè la base colorante venga messa in libertà.

10.° Infine deporrebbero per la teoria chimica anche le

ricerche sperimentali di *M. Heidenhain*. Questi avrebbero dimostrato in una lunga serie di esperimenti *in vitro* che i colori basici di anilina precipitano l'albumina in presenza di alcali ed i colori acidi in presenza di acidi. L'alcali non è assolutamente necessario, ma favorisce la comparsa della reazione, la quale si spiega molto bene con lo schema seguente:

Albuminato alcalino, solfato di Nilblau: solfato alcalino, albuminato di Nilblau.

Poichè i liquidi dell'organismo sono per la massima parte debolmente alcalini e poichè essi contengono in soluzione quantità variabile di albuminoidi, non vi è alcuna ragione di dubitare che questi fatti possano avvenire anche nei tessuti.

Venendo ora alle ragioni per le quali si potrebbe ritenere che la colorazione non sia se non un processo fisico, dobbiamo vedere come tale processo possa venire interpretato. Si è parlato di attrazione molecolare tra gli elementi del colore e quelli del tessuto: ma questa non è una vera spiegazione, è soltanto una definizione. Da molti si è ammessa la dottrina di *Witte* secondo la quale la colorazione non sarebbe che una soluzione solida, ossia il colore starebbe al tessuto nello stesso rapporto con cui la sostanza disciolta sta al solvente. L'espressione di soluzione solida può sembrare in qualche modo strana quando si pensi che il concetto di soluzione e quello di stato liquido paiono inevitabilmente connessi. Il concetto di soluzione consiste però principalmente nell'esservi un'armonia di spazio tra le molecole del corpo disciolto e gli spazi intermolecolari del solvente, di modo che le molecole del primo coincidono bene con questi spazi: soltanto che per quel che riguarda i tessuti animali o vegetali è più probabile che questi spazi, anzichè intermolecolari, siano intermicellari, ossia posti tra gruppi più grandi delle molecole; per tale conclusione parla il fatto che i colori vengono assorbiti sopratutto dalla materia organizzata. Del resto la soluzione solida si può trovare anche nel mondo inorganico, come per es. nel vetro colorato, e nello stesso stato di aggregazione del carbone col ferro e nelle leghe metalliche. Secondo la teoria fisica certe elettività specifiche di alcuni colori per alcune parti dei tessuti si spiegano con la maggiore o minore affinità di soluzione (*Lösungsaffinität*) che il colore ha per il liquido in

cui è disciolto. Una colorazione sarà tanto più rapida ed intensa quanto maggiore è la differenza dell'affinità di soluzione del colore tra il tessuto che deve colorare ed il solvente. Si può dunque aumentare la forza colorante di un colore scegliendo un solvente per cui esso abbia pochissima affinità di soluzione.

Altri argomenti in favore della dottrina fisica sarebbero i seguenti:

1.° Si possono colorare sostanze le quale non sono assolutamente capaci di formare dei sali, come per es. la cellulosa sotto forma di cotone e di carta ed anche certi corpi inorganici di natura indifferente (latte di zolfo, acido silicico gelatinoso).

2.° Vi sono sostanze le quali si colorano con colori neutri senza decomporli.

3.° Molti granuli si colorano vitalmente col rosso neutro il quale è giallo in soluzione alcalina, rosso violaceo se in soluzione acida, giallo rossastro in soluzione neutra. Vi sono alcuni granuli i quali si colorano appunto in giallo e dimostrano con ciò che essi hanno reazione alcalina e che il colore è contenuto in essi sotto forma della sua base libera. Non si è formata dunque una combinazione salina tra la sostanza dei granuli e la base del rosso neutro, poichè in tale ultimo caso i granuli si sarebbero dovuti tingere in giallo rossastro, colore del composto a reazione neutra.

4.° Molte colorazioni si possono *distruggere* trattando il tessuto con un liquido (acqua, alcool, glicerina, anilina) che sciolga facilmente il colore.

5.° Un esempio classico di colorazione puramente fisica è quello del grasso col Sudan III e con lo Scharlach R. Questi colori si possono chiamare indifferenti giacchè non contengono alcun gruppo salificabile; essi colorano le goccie di grasso in quanto si sciolgono facilmente in questa sostanza. Ciò può venir dimostrato senza difficoltà anche *in vitro*, giacchè essi si lasciano estrarre facilmente per agitazione da una soluzione alcoolica al 30 °/₀ per mezzo di varie sostanze grasse (olio di oliva, paraffina ecc).

Secondo *Bechhold* [1] la teoria delle soluzioni solide di *Witte* si può oggi considerare come caduta. Studiando la distribuzione

---

(1) Die Kolloide in Biologie und Medizin. Dresden-Steinkopf, pag. 397, 1912

quantitativa del colore tra fibra e soluzione, si dimostra che essa non corrisponde alle condizioni di una vera soluzione, ma a quelle dell' *adsorbimento*. Dobbiamo questa cognizione alle ricerche di *Aptleyard* e *Walker*, *Biltz–Freundlich* e *Loser*, *Georgievics* e *Pelet*, *Jolivet*. Esse provano ad esempio che non vi è nessuna differenza sostanziale tra l'adsorbimento dell'acido formico per parte del carbone animale e quello del carmino d' indaco per parte della seta. Contro la teoria chimica i sostenitori di quella dell'adsorbimento obbiettano che i colori in soluzione sono fortemente idrolizzati, e che perciò a spiegare la colorazione bastano i fatti di adsorbimento, tanto più che spesso tessuto e colore sono colloidi di carica diversa che si precipitano (*ausflocken*) reciprocamente.

Secondo tale teoria il colore giunge al tessuto sotto forma concentrata per adsorbimento e allora può anche succedere una combinazione chimica cogli elementi del tessuto.

Secondo un'interpetrazione un po' diversa sostenuta recentemente da *L. Michaelis* molte sostanze coloranti conterrebbero nella loro soluzione acquosa il colore sotto forma di particelle ultramicroscopiche le quali come tutte le altre sostanze colloidali avrebbero una carica elettrica o positiva o negativa;tale carica manterrebbe le particelle sospese in opposizione alla legge di gravità: togliendo la carica la sostanza colloidale precipita sotto forma di fiocchi (*Ausflockung*) e si ha la trasformazione dell' idrosol in idrogel.

M. Heidenhain ha studiato e descritto i precipitati che i colori tanto acidi quanto basici formano con gli albuminoidi; questi fatti che *Heidenhain* considera come una prova della combinazione chimica fra la sostanza colorante ed albumina, possono anche essere considerati come un aggruppamento a fiocchi di un colloide per opera di un altro. Avvenuta la formazione di un idrogel questo può ancora combinarsi con ioni e con colloidi sospesi a carica opposta; oltre a ciò gli idrosoli hanno la proprietà di adsorbire molta sostanza disciolta, secondo la legge per cui si forma un equilibrio tra le quantità di sostanza disciolta e quella assorbita dall' idrogel; si ha così un processo che sta in mezzo tra il fenomeno fisico ed il fenomeno chimico; questo ci dimostra che fra i due esistono tutte le forme di passaggio e che è ozioso discutere sulla natura chimica o fisica del processo colorante. Il processo di adsorbimento ha in

questi casi tanto maggiore somiglianza con una semplice soluzione, in quanto le sostanze a reazione reciproca non si combinano secondo le leggi volumetriche, ma si ottiene una colorazione massima che corrisponde alla saturazione della soluzione: d'altra parte in questo processo avviene un equilibrio di cariche elettriche, come nella formazione di sali.

Tale processo spiega anche perchè le basi e gli acidi coloranti liberi tingano talvolta le sostanze albuminoidi, non col colore proprio, ma con quello dei loro sali.

Secondo una dottrina rappresentata dall'*Auerbach* e che si ricollega molto vicino con la teoria fisica della colorazione i vari substrati colorabili non andrebbero distinti in basofili e acidofili, bensì i *cianofili* ed in *eritrofili*. In altre parole certe individualità morfologiche, come i nuclei, tenderebbero ad assumere i colori oscuri, certe altre, come i protoplasmi, i colori a tonalità chiara. Distinzioni analoghe si riscontrerebbero anche riguardo ad altri colori e ad altri substrati, distinguendosi una sostanza eritrofila ed una xantofila.

Secondo *Pappenheim* queste differenze esistono realmente, ma non è lecito contrapporre tali distinzioni di carattere piuttosto contingente e secondario a quelle fondamentali dell'acidofilia e basofilia. Infatti contro la dottrina di *Auerbach* parla il fatto che usando miscugli coloranti in cui il colore basico sia chiaro ed il colore acido oscuro, i nuclei divengono eritrofili ed il protoplasma cianofilo. Ciò significa che scegliendo opportunamente la sostanza colorante, le affinità chimiche elettive prevalgono decisamente sulle affinità fisiche della ciano-ed eritrofilia. Infatti queste distinzioni sono semplicemente in rapporto con la costituzione fisica del substrato e con le grandezze molecolari dei colori, giacchè la sostanza cianofila ha pori più larghi della eritrofila, e questa a sua volta più della xantofila ; viceversa i colori hanno una molecola tanto grande quanto più oscura è la loro tinta. La legge di *Auerbach* ha dunque valore solo quando si tratti di colori della stessa reazione e purchè i substrati siano colorabili tanto con colori acidi quanto con colori basici; allora il colore oscuro prediligerà la sostanza a pori larghi, e viceversa, dimodochè il risultato di queste

colorazioni ci può illuminare soltanto sulla costituzione fisica, non sulle reazioni chimiche del substrato colorabile.

Del resto contro la dottrina puramente fisica di *Auerbach*, parlano anche altri fatti: sostanze che dimostrano basofilia od acidofilia assoluta, come la nucleina ed i granuli eosinofili; differenze specifiche di certi colori in rapporto alla loro costituzione chimica; il fatto che i cromogeni, sostanze colorate solubili senza gruppi elettrochimici attivi, non sono capaci di colorare; i risultati delle colorazioni con miscugli neutri i quali vengono dissociati, mentre ogni substrato assume il colore per cui ha un' affinità elettiva.

Esposti così i dati i più essenziali riguardo alla teoria della colorazione, dobbiamo accennare ad alcuni particolari i quali hanno attinenza con le modalità della colorazione stessa.

Tanto all' industria della tintoria, quanto nella tecnica istologica le colorazioni si distinguono a seconda che sono stabili (*echt*) od instabili (*unecht*). La stabilità dei colori è varia a seconda dei solventi che si adoperano: questi si collocano per solito nella scala seguente:

1° acqua; 2° alcool; 3° acetone; 4° anilina; 5° acidi.

Se una determinata colorazione si lascia togliere da uno qualunque dei quattro primi solventi si tratta unicamente di colorazione fisica (secondo Michaelis *colorazione insorptiva*), se invece essa non si può estrarre che per mezzo degli acidi, si tratta di una colorazione basata sulle affinità chimiche (secondo Michaelis *colorazione ingiuntiva*).

In genere un colore è tanto più resistente quanto meno è solubile, però la resistenza di una data colorazione in una certa parte della cellula non depone per il fatto che debba necessariamente trattarsi di una combinazione chimica, ma vi può essere semplicemente un notevole adattamento volumetrico tra le molecole del colore e gli spazi intermicellari del tessuto. Perciò alla colorazione di una parte di tessuto sono necessari due momenti; uno *chimico*, ossia che le molecole del substrato si possano combinare coi gruppi aptofori del colore; ed uno *meccanico* per cui il colore possa diffondersi tra gli spazi intermicellari ed arrivare alle mi-

celle. La tingibilità dipende dunque dalla tingibilità generale (in senso chimico) e dalla densità del substrato. Per conseguenza essa può venire influenzata dal modo con cui si tratta preventivamente il preparato (fissazione fisica, mordenzatura); sia perchè ne può variare la densità (per coagulazione degli albuminoidi o per sottrazione di acqua) sia perchè ne possano essere modificate le affinità chimiche.

In un colore dobbiamo pure distinguere il suo potere elettivo, dovuto alle affinità chimiche, dalla sua potenza colorante. Il primo dipende dalla costituzione chimica del colore e dalla presenza e qualità dei gruppi aptofori; la potenza colorante dipende invece dalla forma e dalla grandezza delle molecole del colore ed essa determina la stabilità della colorazione; è misurata dalla stabilità dell'unione tra substrato e colore. Un colore basico colora le sostanze basofile tanto più stabilmente quanto maggiore è il numero dei gruppi basici che contiene; lo stesso può dirsi dei colori acidi. Dal punto di vista puramente fisico le sostanze a pori larghi vengono colorate più stabilmente dai colori oscuri, a molecola voluminosa, che non dai colori chiari, a molecola piccola, facilmente diffusibile. D'altra parte i substrati densi, a pori piccoli e ristretti assumono con maggior facilità i colori chiari, che non gli oscuri. Le sostanze a pori di media ampiezza vengono colorate più stabilmente dal colore che ha maggior volume molecolare, perchè in tal caso è più forte l'attrazione delle superfici.

Nelle sostanze a pori larghi i colori chiari non stanno aderenti alle micelle, ma diffondono con facilità. Di due substrati differenti, lo stesso colore tinge più stabilmente quello i cui pori si adattano meglio per dimensioni al suo volume molecolare. Per es. l'acido picrico colora in modo instabile (*rispetto alla glicerina*) le granulazioni ossifile in causa del suo piccolo volume molecolare, invece queste sono colorate stabilmente dall'*Aurantia*, la quale ha una molecola voluminosa adatta ai pori larghi di queste granulazioni; viceversa l'acido picrico colora stabilmente per ragioni analoghe l'emoglobina.

Adunque, perchè una colorazione possa avvenire sono necessarie alcune condizioni fisiche (permeabilità sufficiente degli spazi intermicellari) ed oltre a ciò è indispensabile che il colore sia ri-

tenuto dalle micelle del tessuto tanto per attrazione superficiale quanto per affinità chimica.

L'affinità fisica si misura in ordine crescente con questi solventi:

1° acqua; 2° glicerina; 3° alcool.

L'affinità chimica con gli acidi:

1° acetico; 2° cloridrico; 3° nitrico.

È legge generale di tecnica istologica che la basofilia e l'ossifilia dei tessuti non si possono stabilire con colorazioni monocromatiche, ossia per mezzo di una sola sostanza colorante. Sono invece necessarie le colorazioni policromatiche in cui la differenziazione tra le due sostanze non deriva dalla maggiore o minore stabilità di un colore per un certo substrato; ma dipende qualitativamente dalle varie differenze della colorazione; in altre parole non è in funzione dell'energia cromatica, ma dell'affinità elettiva del colore.

Le modalità della colorazione istologica possono cambiare a seconda del trattamento a cui è stato preventivamente sottoposto il tessuto. Per es. disidratando il substrato, si ha, fino ad un certo punto aumento, poi indebolimento della colorabilità; d'altra parte, aggiungendo acqua ad un tessuto iperfissato, si ha dapprima aumento, poi diminuzione della colorabilità per rigonfiamento (*Quellung*) delle sostanze albuminoidi.

Qualcosa di analogo avviene trattando un tessuto con reattivi chimici: per es. gli alcali ed i sali alcalini dànno rigonfiamento e diminuzione di colorabilità, invece gli acidi organici ed inorganici coi loro sali metalloidici e metallici dànno coagulazione degli albuminoidi ed aumento di colorabilità (fissazione). Anche la soluzione colorante può venire alterata chimicamente. Gli acidi decolorano i colori basici e rinforzano gli acidi, e viceversa. Fatti analoghi si hanno per un'azione degli acidi e degli alcali sulla colorazione già avvenuta. Si ottiene così una specie di mordenzatura del tessuto, la quale avviene però coi cosidetti mordenti *impropri*. Invece i *mordenti propriamenti detti* conferiscono direttamente al substrato la basicità o l'acidità che gli mancano, dimodochè viene creata un'affinità per certi colori, che prima non esisteva. Essi dànno dunque al tessuto il carattere chimico necessario per la combina-

zione coi principi attivi dei colori acidi o basici. Servono come mordenti l'acetato d'allumina, il solfato d'allumina, l'allume, il tartrato potassico, i sali di ferro e di cromo: essi formano coi colori le cosidette *lacche*, ossia delle combinazioni per lo più insolubili ed *acido-resistenti* in cui la sostanza colorante è legata ad un acido metallico od all'ossido di un metallo pesante. L'esempio forse più classico in istologia è dato dalla colorazione delle guaine mieliniche col metodo di *Weigert* in cui avviene una combinazione chimica stabile tra il sale di cromo fissato sulla mielina da un lato e l'ematossilina dall'altro. Del resto sono colorazioni a mordente anche le più comuni col carmino e con l'ematossilina in cui l'allume, il borace, i sali di ferro permettono un legame stabile tra l'acido carminico o l'ematossilina da una parte, la nucleina dall'altra.

Tornando poi ai cosidetti mordenti impropri, essi possono agire in varie maniere, facilitando l'assunzione del colore da parte del substrato:

1° per coagulazione del tessuto vivente (acidi);

2° per rigonfiamento del tessuto troppo denso (alcali);

3° per aumentata diffusibilità (acqua d'anilina, acqua carbolica);

4° por aumentata dissociazione dei sali coloranti (acidi ed alcali).

Non possiamo finire l'argomento delle leggi della colorazione nei preparati fissati senza accennare alla questione ancora piuttosto oscura e controversa della colorazione della sostanza neutrofila. A questo proposito secondo *Pappenheim*, noi possiamo pensare a quattro diverse possibilità:

1° può trattarsi di *neutrofilie improprie* nel senso di *Heidenhain* e cioè come una varietà della basofilia od ossifilia amfofila; il substrato sarebbe amfofilo, non veramente neutrofilo, con prevalenza dell'uno o l'altro dei ricettori;

2° una neutrofilia specifica per la presenza di gruppi aptofori neutri indifferenti: questo modo di vedere non è conciliabile con le dottrine chimiche attualmente vigenti.

3° i gruppi aptofori acidi e basici del substrato sarebbero rispettivamente occupati da gruppi basici o acidi di uno o due co-

lori; per conseguenza i substrati neutrofili consisterebbero di ricettori liberi di uguale energia, gli uni basici e gli altri acidi, posti gli uni accanto agli altri a modo di mosaico. Anche le comuni molecole albuminoidi sono amfotere, però se trattate con miscugli di colori basici ed acidi vengono colorate soltanto da uno di questi colori.

4° legame fisico di un sale colorante completamente neutralizzato senza ricettori liberi. Noi non possiamo seguire *Pappenheim* nella lunga e dottissima discussione che egli fa in proposito: ci limiteremo a riportare le sue conclusioni. Egli ammette che si possano formare bensì sali coloranti neutri, ma crede che la combinazione di questi colori col substrato avvenga sempre per via di ricettori puramente acidi o puramente basici, cioè per il fatto che i colori neutri hanno sempre a loro disposizione dei gruppi liberi acidi o basici; essi si distinguerebbero dai comuni colori acidi o basici solo per una notevole grandezza della loro molecola. Per conseguenza il colore neutro si combinerebbe con la sostanza neutrofila per mezzo dei suoi recettori liberi rispettivamente acidi o basici, ma il colore per se stesso rimarrebbe indissociato e perciò senza cambiamento di *nuance*.

Con questa dottrina di *Pappenheim* è abbastanza bene conciliabile anche quanto molto giustamente fa osservare *Michaelis* e cioè che i miscugli cosidetti neutri che si usano in pratica sono ben lungi dal contenere in soluzione colori neutri chimicamente puri e corrispondentemente devono essere molto differenti anche le loro proprietà.

La colorazione vitale può avere due scopi: l'uno *fisiologico*, come lo studio delle proprietà riducenti dei tessuti; questa ricerca è già stata fatta in modo magistrale dall' *Ehrlich*, ma noi non dobbiamo occuparcene perchè l'argomento è estraneo al nostro scopo; l'altro *istologico*, ossia quello di profittare dell'elettività che alcuni colori hanno per certi tessuti onde ottenere la colorazione di elementi che non si possono dimostrare sul tessuto fissato; così, per es. la colorazione delle fibre amieliniche e delle terminazioni nervose con l' iniezione intravitale di bleu di metilene o la colorazione di particolari filamenti negli epiteli delle ghiandole salivari col *Diazingrün*.

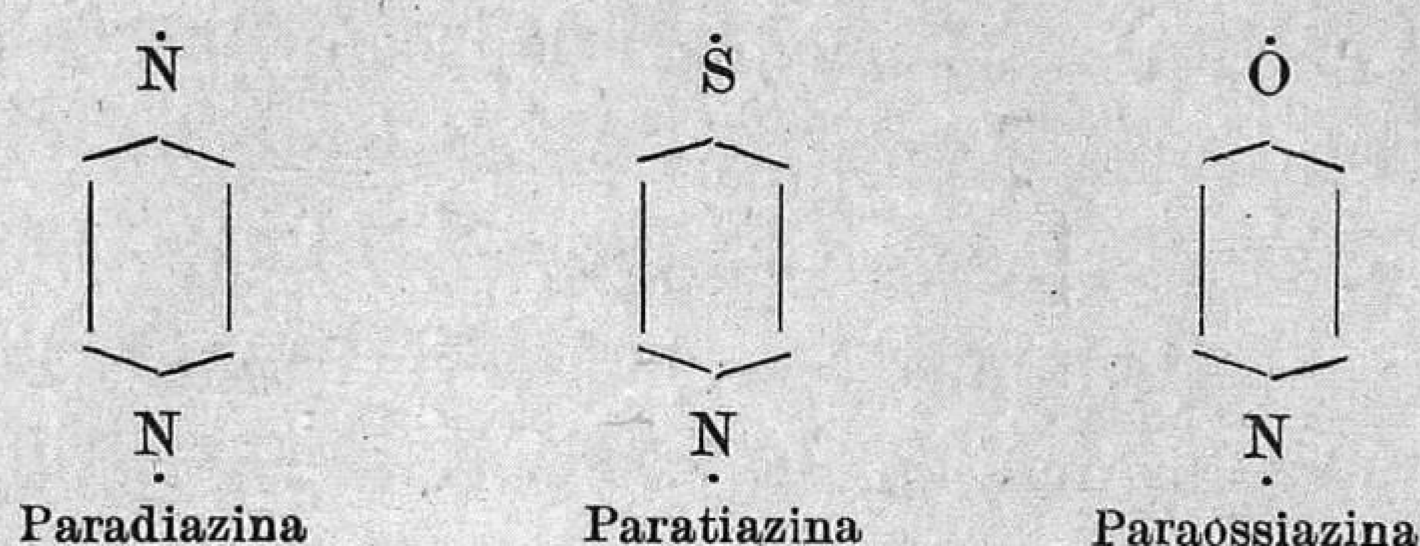
Prima di entrare nei particolari della dottrina della colorazione vitale, noi dobbiamo far notare con *M. Heidenhain* che le sostanze coloranti presentano almeno in apparenza molte analogie con le sostanze albuminoidi; infatti esse hanno in comune l'alto peso molecolare, il nucleo aromatico, le catene laterali molto numerose e svariate, la complessità della struttura e le proprietà colloidali.

È vero che i colori sono sostanze estranee all'organismo, però possono circolare in questo, distribuirsi in modo tipico, subire alterazioni specifiche, dimodochè la conoscenza dei processi della colorazione vitale può riuscire importante per ogni biologo.

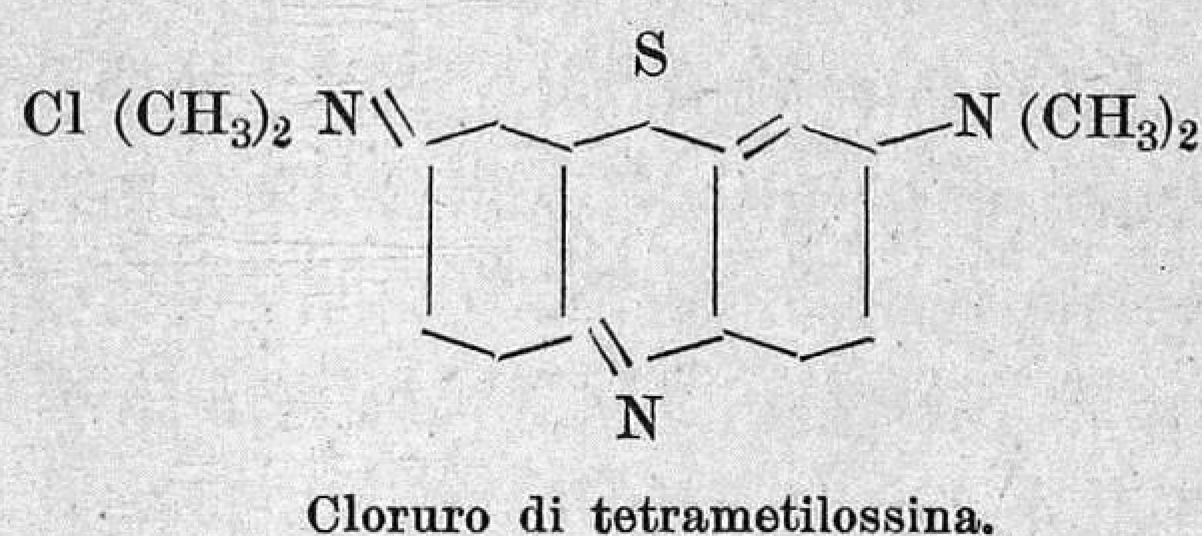
Tutte le sostanze coloranti le quali sono capaci di colorare vitalmente appartengono in modo esclusivo ai colori basici di anilina, non solo ma, come è già stato notato da *Ehrlich*, in mezzo al numero enorme di tali colori non vi è che un piccolo gruppo di corpi molto affini tra loro i quali si prestino alla colorazione vitale. *Ehrlich* aveva trovato fin dal 1886 dei risultati positivi oltrechè col bleu di metilene, anche con le tionine, dimetiltionine, violetto di metilene e *metylenazur:* tutte queste sostanze appartengono al gruppo dei colori cosidetti di *Lauth.* Più tardi si è constatato essere adatti a questo scopo anche il rosso neutro ed il violetto neutro ad esso molto affine, e più tardi anche il solfato e cloridrato di Nilblau ed il bruno di Bismarck.

Invece coi colori acidi (Congo, tropeolina, orange) si è bensì ottenuto qualche risultato positivo, ma scarso e deficiente. È a questo proposito interessante di sapere come colori di anilina uguali riguardo al nucleo, ma differenti per la presenza di gruppi acidi o basici, acquistino o perdano la proprietà della colorazione vitale a seconda della reazione dei gruppi aptofori; per es. un colore vitale basico perde tale proprietà se si sostituiscono alcuni atomi di idrogeno col gruppo sulfonico (SO_3H).

Per quanto riguarda la struttura chimica dei colori vitali, essi contengono tutti un anello simmetrico eterociclico di sei gruppi in cui o due atomi di azoto o un atomo di azoto ed uno di zolfo, o un atomo di azoto ed uno di ossigeno si trovano rispettivamente in posizione *para.*

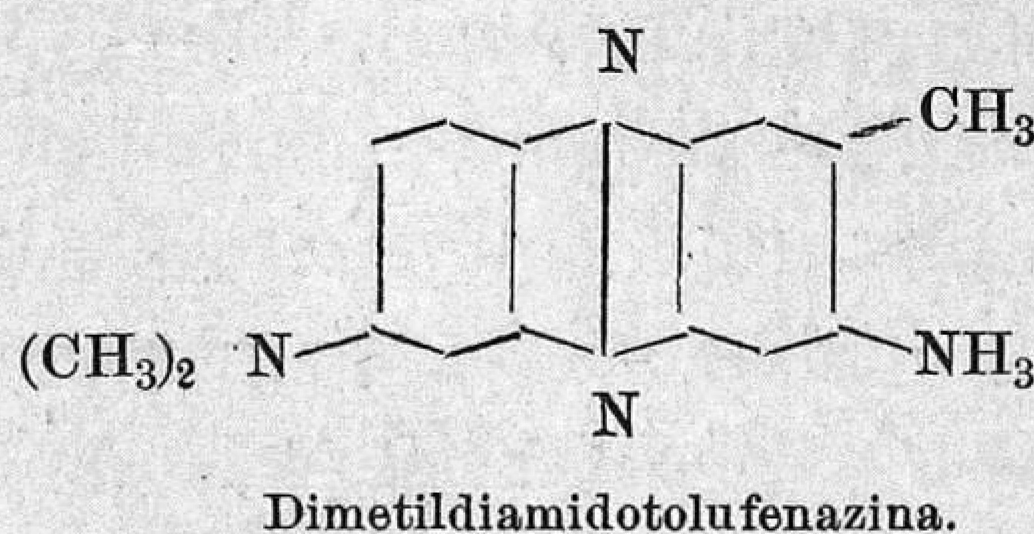


Come esempio del gruppo tiazinico addurremo il bleu di metilene



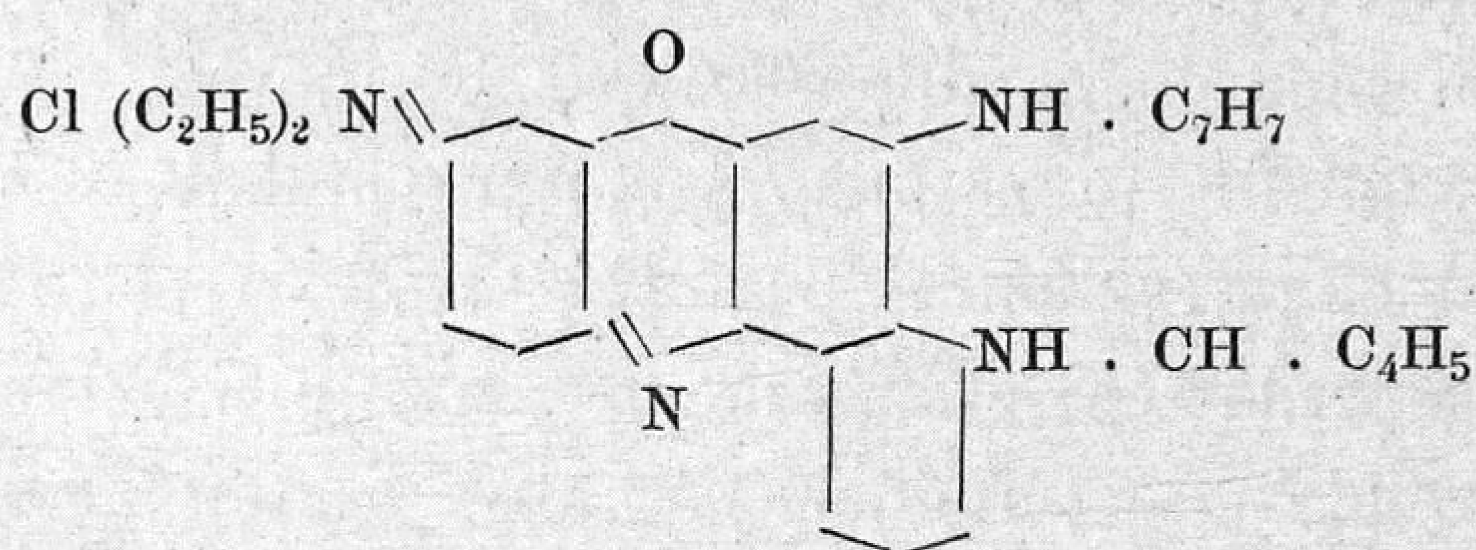
Cloruro di tetrametilossina.

Il gruppo delle azine invece è rappresentato dal rosso neutro.

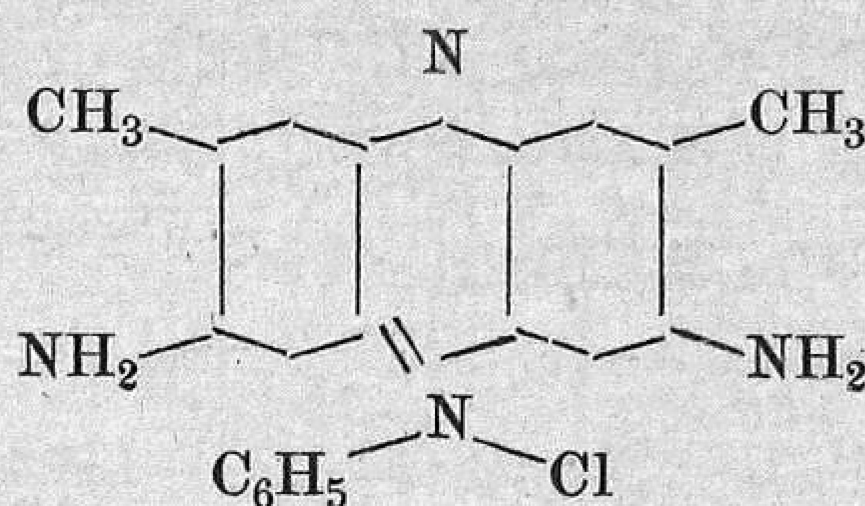


Dimetildiamidotolufenazina.

Alle paraossiazine appartengono il cloridrato di Nilblau ed il Brillantcresylblau.



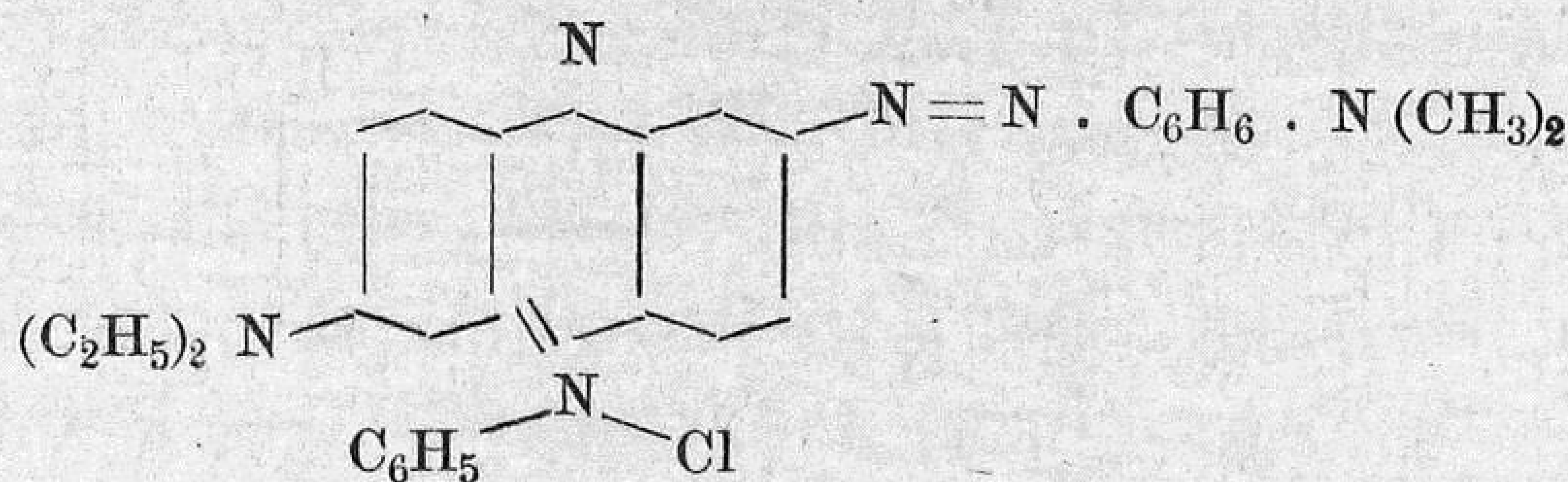
Sono analoghi a questi çorpi anche le safranine le quali si distinguono dalle combinazioni sopraccennate per il fatto che uno dei due atomi di azoto che si trovano nell'anello eterociclico diviene pentavalente, dimodochè si forma il così detto gruppo *di azonio.* Con ciò viene ridotta ad un minimo la capacità della colorazione vitale.



Cloruro di tolusafranina.

Gli altri colori di anilina capaci di colorazione vitale presentano costituzione piuttosto varia: la crisoidina è un azocolore basico: il bruno di Bismarck un diazocolore basico, la tropeolina, l'orange ed il Congo cono azocolori acidi; il Janusgrün è un azocolore basico: esso è analogo alla safranina, ma le sue attitudini alla colorazione vitale sono maggiori perchè si ritorna alla serie degli azocolori.

La sua formula è



In certe forme di colorazione vitale e specialmente in quelle del tessuto nervoso secondo *Ehrlich*, hanno grande importanza i fenomeni di ossidazione e di riduzione: in genere quasi tutti i colori di anilina possono essere trasformati per riduzione in combinazioni incolore (*leucobase*) ed una parte di essi può ritrasformarsi per riossidazione nella sostanza colorata. Però essi possono essere divisi a seconda che la riossidazione secondaria è facile sia a contatto del tessuto, sia a contatto dell'aria, o che tale processo non avviene, perchè la riossidazione non è possibile oppure per essa si forma un altro colore.

Appartengono alla 1ª classe (*Küpenfarbstoffe*) i colori più spiccatamente vitali (azine, tiazine, ossiazine), colla seconda specialmente i colori dell'azogruppo in cui il nucleo è decomposto dal processo di ossidazione.

È chiaro che per la spiegazione e la valutazione dei risultati della colorazione vitale è necessario di conoscere le condizioni

fisiche e chimiche e le ragioni delle differenze caratteristiche tra la colorazione vitale e la non vitale.

Ora, secondo *M. Heindenhain* i colori basici sono tutti colloidali; perciò essi non diffondono senz'altro; sorge perciò la questione come sia possibile la loro penetrazione nel protoplasma.

La dottrina più importante in proposito è quella di *Overton*.

Secondo quest'autore le cellule riguardo alla permeabilità si comportano come se fossero circondate da una membrana lipoide: le sostanze solubili nei lipoidi vi penetrano; le insolubili non possono farlo, e perciò determinano la plasmolisi, se sono in soluzione concentrata. La solubilità relativa di una sostanza viene determinata dalla proporzione rispettiva con cui essa si distribuisce tra due solventi (quoziente di distribuzione). La teoria di *Overton* può dunque essere così riassunta: le sostanze solubili nei lipoidi di cui è composta la membrana cellulare, sono capaci di osmosi cellulare: quest'ultima è tanto minore, quanto più piccolo è il quoziente di distribuzione $\frac{\text{lipoide}}{\text{acqua}}$.

Di questa legge si possono trovare diversi esempi pratici.

1° Per es. secondo *Ehrlich* i colori neurotropi sono anche lipotropi e cioè i colori i quali sono capaci di colorare vitalmente gli elementi nervosi sono anche solubili nei lipoidi.

Lo stesso autore ha pure espresso l'ipotesi che gli alcaloidi neurotropi siano anche lipotropi;

2° il cloroformio viene assorbito più dagli elementi cellulari che dal siero, in quanto è solubile nella colesterina e lecitina.

3° I globuli rossi sono permeabili secondo *Gryns*, per gli alcool monovalenti, gli eteri, gli eteri composti, la glicerina, l'urea (tutte sostanze solubili nei lipoidi): invece sono impermeabili per i sali neutri, la mannite, il destrosio, il saccarosio, il lattosio, tutte sostanze insolubili nei lipoidi; dànno emolisi i sali d'ammonio per idrolisi e liberazione della base NH_4OH solubile nei lipoidi.

Adunque, secondo *Overton*, i colori vitali sarebbero tali in quanto sono solubili nei lipoidi. Da principio *Overton* trovò un grave ostacolo alle sue dottrine, giacchè sostanze le quali dànno la più squisita colorazione vitale, come per es. il bleu di metilene

sono insolubili in olio, benzolo e xilolo. Esse però sono solubili in colesterina e lecitina, ossia in componenti dello stroma e della membrana cellulare. Sono adunque colori vitali solo quelli che si sciolgono in colesterina e lecitina (naturalmente la solubilità si prova per mezzo di soluzioni dei lipoidi in olio di oliva, benzolo, xilolo, olio di trementina). La dimostrazione della penetrazione del colore nell'interno della cellula può presentare qualche difficoltà, perchè il colore può non apparire se non in uno strato molto piccolo, e le strutture lipoidi possono essere tanto sottili da non riuscire visibili. Invece in molte cellule animali vi sono dei granuli i quali accumulano in sè la sostanza lipoide e la rendono bene visibili.

Alcuni colori tingono vitalmente solo in apparenza in quanto sono tossici e penetrano attraverso alla membrana plasmatica alterata; altri invece apparentemente non sembrano adatti alla colorazione vitale perchè vengono subito ridotti nell'interno della cellula. Alcune cellule, come per es. gli epitelii della porzione iniziale dei tubuli renali, assumono tutti i colori vitali ed anche parecchi altri.

Non mancano però i fatti contraddittori alla dottrina di *Overton*. Per es. vi sono colori insolubili nei lipoidi che colorano vitalmente (tionine, verde di metilene). Vi è pure un colore solubile nei lipoidi (*Echtrot A.*) che ciò malgrado non colora vitalmente; lo stesso può dirsi di alcuni colori acidi (cianosina, eritrosina, galleina, *Rose*, *Bengale*) (1).

Non possiamo tacere infine alcune obbiezioni mosse da *Heidenhain* a questa dottrina e cioè che la colorazione vitale per eccellenza, quella del sistema nervoso col bleu di metilene, ha luogo sopratutto nelle fibre nervose amieliniche, mentre la guaina mielinica squisitamente lipoide presenta un ostacolo insormontabile alla penetrazione del colore.

Oltre a ciò secondo *Miescher* le code degli spermatozoi del salmone contengono molta colesterina e lecitina, mentre le teste lasciano poco estratto etereo. Ciò nondimeno in un miscuglio di colori acidi o basici le teste assumono i secondi, le code i primi.

---

(1) Per una più ampia discussione intorno a questo interessante argomento rimandiamo il lettore al lavoro di *Höber*, cap. VII, p. 237-238.

Resta a vedere se la colorazione vitale possa avvenire per un processo di soluzione solida analogo a quello ammesso dal *Witte* a cui abbiamo accennato più sopra. Affinchè il processo della colorazione vitale si svolgesse a questo modo, sarebbe necessario, secondo *Heidenhain*, che gli elementi cellulari od alcune delle loro parti costituenti, fossero migliori solventi per il colore che non i liquidi dell'organismo.

Ora, poichè vediamo che i tessuti viventi si rifiutano alla penetrazione del colore, sempre secondo *Heidenhain*, si deve attribuire solo scarsa importanza al processo delle soluzioni solide. Vedremo in seguito come ciò nondimeno possa venire interpretata la colorazione vitale.

Heidenhain pensa invece che essa abbia luogo per un processo analogo a quelle combinazioni chimiche che si hanno nei tessuti fissati e di cui ci siamo occupati a luogo più sopra. Quanto alla differenza fra i colori acidi ed i basici conviene osservare che mentre questi ultimi dànno senz'altro un precipitato con le soluzioni albuminoidee, invece i colori acidi precipitano l'albumina solo quando l'acido colorante venga messo in libertà per l'aggiunta di acido acetico. Quindi verisimilmente anche nell'organismo i colori acidi non possono formare combinazioni albuminoidee. I sali basici in causa dell'alcalinità degli umori vengono dissociati almeno in parte e resi attivi di fronte all'albumina; invece nei sali colcranti acidi si ha precisamente l'opposto: il loro grado di dissociazione è diminuito.

Se dunque i colori acidi vengono introdotti nell'organismo essi si comporteranno anzi tutto come altri sali indifferenti, come per es. il cloruro sodico. Questo comportamento dei colori acidi di fronte all'albumina può spiegarci perchè essi servono assai poco alla colorazione vitale.

Uno dei problemi più importanti, forse anzi il più importante nella dottrina della colorazione vitale è quello di riconoscere se le porzioni che si colorano siano veramente vive e vitali e in caso affermativo, se le parti viventi si combinino chimicamente col colore e se invece non si tratti che di una deposizione fisica o meccanica di particelle estranee nella sostanza vivente, ossia di un'impregnazione nel senso più largo della parola.

Conviene premettere che le affinità degli elementi dei tessuti per i colori sono completamente diverse a seconda che essi sono vivi o morti. Per es. i filamenti cromatici delle mitosi si lasciano colorare molto bene nei preparati fissati da quei colori (bleu di metilene, rosso neutro) che più sono adatti alla colorazione vitale; viceversa nè il nucleo vivente, nè i filamenti cromatici possono venir messi in evidenza con tale colorazione. D'altra parte nei preparati fissati, fatta eccezione per i corpi di *Nissl*, i granuli del plasma non mostrano punto una spiccata affinità per i colori basici di anilina, mentre colorando vitalmente con certi colori si possono dimostrare abbondantissime quantità di granuli nel corpo cellulare. Non si può dunque applicare senz'altro alla colorazione vitale la teoria delle affinità chimiche degli albuminoidi per i colori di anilina; anzi si deve dire che il protoplasma vivente non è in grado di combinarsi direttamente con le sostanze coloranti; però non è escluso che i colori possano reagire con sostanze albuminoidi morte e disciolte negli umori. Secondo *Ehrlich* non è da pensare ad una combinazione delle sostanze introdotte col plasma vivente. Egli fa osservare che la maggior parte dei veleni come gli alcaloidi, i fenoli, ecc. ed anche sostanze coloranti, come la fucsina, il bleu di metile, possono essere completamente estratti dai tessuti per mezzo di solventi adatti: oltre a ciò non si è mai osservato che i colori vengano alterati nell'organismo vivente per un processo di sintesi, e specialmente non si è mai nótato un corrispondente cambiamento nella loro *nuance*. Si tratta adunque di sostanze che il protoplasma vivente si rifiuta di accogliere, mentre invece quei corpi chimici che vengono assorbiti secondo il tipo delle sostanze nutrienti possono entrare in combinazione sintetica col protoplasma vivente stesso. Gli animali colorati con iniezione di Trypanblau partoriscono figli incolori; così pure culture di batterii colorati vitalmente con aggiunta di colore al substrato nutritivo, nei trapianti dànno luogo a colonie incolore. Per conseguenza a spiegare la colorazione vitale rimangono solo due ipotesi possibili e cioè:

1° La formazione di *lacche* ossia di prodotti insolubili tra il corpo estraneo ed i prodotti del ricambio o di secrezione della cellula.

2° La soluzione specifica, sia nel senso di *Witte*, sia nel

senso di *Overton.* In conclusione, poichè nell'un modo o nell'altro non ha luogo una sintesi col protoplasma vivente, ne viene che il processo vitale ha importanza soltanto indiretta nello svolgimento della così detta colorazione vitale e cioè in quanto per esso vengono creati quello stato chimico e fisico, quell'ambiente interno dei tessuti, senza del quale non sono possibili le colorazioni vitali specifiche. Ma se si esige una sintesi del colore col protoplasma vivente, una colorazione vitale in questo senso non esisterebbe affatto.

Per conseguenza noi ci dobbiamo accontentare di designare come colorazione vitale quella che non può aver luogo senza l'attività normale del protoplasma e che va perduta quando questa attività vitale vada distrutta. Ne viene che si possono colorare vitalmente dei tessuti morti in quanto dopo la morte non si è ancora troppo profondamente alterato l'ambiente interno del protoplasma.

Quanto alla colorazione intravitale dei granuli cellulari le opinioni degli autori non sono concordi. Per es. *O. Schultze* e *Mitrophanow* ed *Altmann* credono che la colorazione intravitale dei granuli sia un argomento in favore della dottrina di *Altmann* secondo la quale gli elementi viventi del protoplasma avrebbero struttura granulare. Di una opinione analoga è recentemente anche *Fischel* secondo il quale i granuli sarebbero almeno per la massima parte, formazioni viventi, ossia organi cellulari. Invece *Galeotti*, *Plato* ed altri ritengono che nell'interno della cellula si lascino colorare vitalmente soltanto dei prodotti non viventi a struttura granulare. Secondo *Heidenhain* conviene anzitutto farsi la domanda, quali forme di granuli si colorino vitalmente e quali no. Sta di fatto che il concetto di granulo in senso lato comprende soltanto una semplice espressione morfologica la quale può abbracciare del materiale molto eterogeneo. Infatti accanto ai veri granuli (granuli di secrezione nelle ghiandole, granuli di pigmento) si trovano anche i prodotti della degenerazione granulosa, alcuni vacuoli e finalmente tutti quei granuli che non si possono trovare nè sul preparato a fresco, nè in quello fissato e che sono dimostrabili solo per mezzo della colorazione vitale.

Prima di tutto quasi tutti gli autori sono concordi nell'am-

mettere che nè i corpi cromatinici del nucleo, nè il nucleo stesso sono colorabili vitalmente. Ciò, bene inteso, vale purchè si adoperino soluzioni coloranti sufficientemente deboli per poter essere assorbite a poco a poco dai granuli viventi senza agire in modo tossico. Questo risultato negativo non può essere dato da un'eventuale impermeabilità della membrana nucleare, giacchè non si colorano nemmeno i cromosomi delle mitosi. Oltre a ciò nelle colorazioni sopra vitali col rosso neutro o col bleu di metilene si è osservato costantemente che la colorazione del nucleo ha luogo coll'inizio della morte della cellula. Sono molto istruttive a questo proposito le osservazioni di *Plato* secondo il quale nei fagociti non si colora già il nucleo della cellula fagocitante, bensì i nuclei delle cellule morte e fagocitate. Così pure non sembra si sia mai riusciti a mettere in evidenza per mezzo della colorazione vitale i microsomi cellulari (granuli o bioblasti di *Altmann*). Infatti i granuli ottenuti con la detta colorazione sono molto più grandi di queste formazioni elementari e non dimostrano quella regolarità nella disposizione che è caratteristica di tali elementi. I granuli neutrofili dei leucociti, secondo *Heidenhain*, che li giudica veri granuli, non si colorerebbero vitalmente ed i granuli eosinofili e quelli delle Mastzellen che si lasciano invece colorare assai bene rappresenterebbero piuttosto i prodotti di escrezione o di trasformazione del protoplasma vivente. Sembrano colorarsi vitalmente alcuni granuli ghiandolari come quelli delle cellule epatiche e delle ghiandole salivari. Accenneremo poi al fatto che secondo *Plato*, la colorazione di certi granuli intracellulari sarebbe dovuta ad una specie di processo di secrezione interna, per cui il colore, assorbito dalle cellule viventi, viene poi secreto attorno al corpo straniero, inglobato dalla cellula. Per es. se si introduce nel peritoneo di una cavia una certa quantità di detrito cellulare sterile, si forma un essudato i cui leucociti contengono abbondanti granuli colorabili col rosso neutro. Essi sono certamente corpi albuminoidi fagocitati, giacchè non si ritrovano nei leucociti dell'essudato di un altro animale al quale non sia stato iniettato che brodo sterile. In modo analogo si tingono i bacilli del carbonchio, tanto vivi quanto morti inglobati nei leucociti della cavia. Se i bacilli sono vivi la colorazione va poi rapidamente perduta, forse per riduzione, mentre i ba-

cilli morti conservano il colore. I gonococchi viventi inglobati dalle cellule di pus assumono il colore in parte molto intensamente, mentre al di fuori della cellula vivente nello stesso preparato i cocchi viventi non si colorano, i morti solo debolmente. Noi abbiamo dunque il fatto notevole, che dei corpi i quali per sè stessi sono poco o punto colorabili col rosso neutro, lo diventano invece dopo essere stati inglobati dal protoplasma dei leucociti. Se si pongono i leucociti contenenti i batteri colorati in soluzione clorosodica questi si decolorano, lo stesso effetto si ha se i leucociti muoiono o vengono in qualsiasi modo alterati.

Questi fatti non si osservano invece quando s'introducono nel peritoneo di una cavia dei corpi inorganici come inchiostro di china o limatura di ferro, intorno ai quali non si produce secrezione colorata. Ne risulta che i corpi organici vivi o morti, per sè stessi non colorabili dal rosso neutro, acquistano la proprietà della colorazione vitale per il fatto di essere stati incorporati nella cellula vivente; la colorazione è dunque dipendente dallo stato vitale del plasma e può essere riferita a *secrezione interna.* Questo nome non è stato scelto felicemente, perchè, come è noto, col termine di secrezione interna si suol designare abitualmente tutt'altra cosa. Forse sarebbe più opportuno dire *secrezione intracellulare.*

Venendo ora ai granuli propriamente detti il risultato più importante di numerose ricerche eseguite specialmente da *Ehrlich*, *Arnold* e *Fischel* si è che usando parecchi colori e specialmente il rosso neutro compaiono in molte cellule delle formazioni granulari, la cui esistenza non era stata prima nè meno supposta. Poichè in molti casi questi granuli non sono dimostrabili con altri metodi, sembra lecita la supposizione che non si tratti di elementi corpuscolari, ma di spazi alveolari o di vacuoli i quali o preesistevano già normalmente e secondariamente sono stati colorati, oppure si sono formati in seguito all'introduzione del colore per il così detto processo di secrezione interna o intracellulare che dir si voglia.

Per mezzo di questa verrebbero in qualche modo iniettati dal colore dei sottili spazi interplastici i quali potrebbero anche addirittura venire creati di sana pianta. Con questa supposizione si spiegano bene anche i risultati delle ricerche sopracitate di *Plato.* Basta infatti ammettere che ogni corpo straniero giaccia in un al-

veolo del protoplasma cellulare circondato da uno speciale strato limitante: l'attività della sostanza cellulare farebbe sì che il colore si accumuli in questi alveoli imbevendo la sostanza inclusa. Bisogna poi anche tener conto dell'azione tossica dei colori vitali basici, la quale può costituire una causa d'errore non indifferente in tutto quest'ordine di ricerche. Le soluzioni concentrate di questi colori agiscono come veleni protoplasmatici e danno luogo a secrezioni vacuoliformi le quali in primo tempo sono scolorite poi si tingonò col colore vitale stesso.

I veleni tipici del protoplasma come per es. la coniina e l'idrazina mettono in evidenza dei vacuoli, delle sfere o dei granuli i quali poi si possono colorare vitalmente col bleu di metilene.

Da quanto abbiamo esposto risulta anzitutto che la cosidetta colorazione vitale mette in evidenza una serie di formazioni molto eterogenee. A seconda delle circostanze si colorano materiali vivi e morti, corpuscoli solidi e vacuoli, liquidi, formazioni preformate ed altre neoformate. Le condizioni che determinano la soluzione e l'assorbimento del colore devono essere determinate caso per caso, senza contare che ci può facilmente sfuggire l'assorbimento dei leucoprodotti.

Secondo *Heidenhain* è probabile che non tutte, ma almeno alcune delle formazioni che si colorano vitalmente, siano realmente granuli viventi (granuli pigmentari dei cromatofori, granuli di secrezione delle ghiandole).

Però anche in questo caso, come nella colorazione della sostanza nervosa, la colorazione ha luogo senza una vera combinazione chimica del colore colla sostanza vivente. Si colorano invece molto bene i componenti morti del contenuto cellulare di qualunque natura essi siano, e cioè tanto i residui organici fagocitati, quanto quelle disposizioni sferiche, verosimilmente albuminose che si producono nel protoplasma cellulare per azione dei veleni.

Però può anche aver luogo una combinazione sintetica dei colori basici coll'albumina; cioè quando si colorano gli spazi vacuolari morti del protoplasma in quanto essi contengono un liquido albuminoideo.

Concludendo, secondo *Heidenhain* la così detta colorazione vitale dei granuli non ha finora portato a nessun risultato fruttifero

per la dimostrazione dei granuli elementari viventi delle cellule, giacchè i granuli dimostrabili vitalmente differiscono completamente per disposizione e per dimensioni dei veri granuli primitivi dimostrabili con altri metodi. Quanto si mette in evidenza con la colorazione vitale è un insieme di fenomeni piuttosto eterogenei. Ciò nondimeno tale campo può essere appunto per questo molto ricco di frutti per la biologia, la quale può attenderne anche in avvenire notevoli conclusioni teoriche.

Grande importanza per la colorazione vitale hanno le ricerche recentissime di *Goldmann*.

Questo autore ritiene che una sostanza colorante, per poter essere chiamata vitale *senso strictiori* debba soddisfare alle condizioni seguenti:

Il colore deve permanere a lungo nell' organismo; non deve essere tossico; deve penetrare nell' interno delle cellule e colorare possibilmente delle formazioni non accessibili agli altri mezzi ottici da noi posseduti. Per es., non è colore vitale l' eosina, che iniettata ad un topo lo colora in rosso, ma in modo transitorio, senza dar luogo ad una colorazione cellulare specifica; non lo è neppure il rosso neutro, perchè è molto tossico, e colora tanti elementi intra- ed estracellulari, che non ci è dato di decidere quali appartengano realmente alla cellula viva, e quali siano prodotti dall'azione tossica del colore. Sono invece colori veramente vitali il Trypanblau, il Pyrrolblau e l'Isaminblau. Essi furono studiati dapprima dall' *Ehrlich*, poi da *Nicolle* e *Mesnil* specialmente a scopo chemoterapeutico; finalmente *Goldmann* e *Schulemann* ne eseguirono un largo studio a scopo istologico.

La distribuzione di queste sostanze coloranti nell'organismo è influenzata da una serie di fattori fisiologici e patologici. Per es., se un animale già colorato con queste sostanze diviene gravido, si scolora la superficie esterna del corpo, e si colora invece la placenta, la quale ha per il colore un'affinità così forte, che l'assorbe dissociandolo e sottraendolo dalle altre cellule già colorate vitalmente. Il colore si accumula pure in quei punti, in cui insorge uno stimolo patologico (cauterizzazione, infiammazione, tumore, parassita). Il rene è l'unica ghiandola a secrezione esterna che assorbe questi colori sotto forma di fini granuli di escrezione, che si

scorgono nelle cellule dei tubuli contorti. In condizioni patologiche, si ha invece una colorazione diffusa od una colorazione nucleare. Nel fegato si ha invece quasi esclusivamente una colorazione delle cellule di *Kupfer,* le quali, ciò non di meno, non perdono affatto le loro proprietà fagocitarie (assorbimento dell' inchiostro di China introdotto nel peritoneo, per parte delle cellule già colorate vitalmente). Anche nel fegato si ha la colorazione diffusa delle cellule in via di necrobiosi. Si hanno colorazioni caratteristiche pure nelle capsule surrenali, nei testicoli (cellule interstiziali), nelle ovaie (cellule della zona radiata del follicolo). Nella pelle si colorano particolarmente alcune cellule rotonde, mononucleate, delle dimensioni di un grosso linfocita, che si trovano specialmente nel. tessuto sottocutaneo (*Pyrrolzellen*). Queste cellule non derivano nè dai globuli bianchi del sangue, nè dalla parete vasale, ma si colorano in tal modo soltanto le cellule migranti d'origine istogena, non quelle d'origine ematogena. Le così dette macchie lattee dell'omento constano quasi esclusivamente di queste *Pyrrolzellen.* Questi elementi possiedono dunque un' alta sensibilità chemotattica, una squisita capacità di migrazione, non che proprietà fagocitarie. Questi risultati sono stati confermati recentemente da *Pappenheim* e *Nakaño*, i quali trovarono pure molte analogie con la reazione delle ossidasi.

Dal punto di vista teorico resta a chiedersi, se vi sia un rapporto tra la costituzione chimica e la distribuzione dei colori vitali. Questi fatti sono stati studiati da *Schulemann*, ma non ancora risolti in modo definitivo.

È infine importantissima la questione, se la reazione che si osserva in queste cellule dipenda o no dalla presenza di un corpo reattivo specifico nel protoplasma cellulare. *Goldmann* ritiene che, quanto all' interpretazione dei granuli, non si possa parlare di prodotti di secrezione, nè di origine fagocitaria; così pure egli nega che i granuli così messi in evidenza possano rappresentare il prodotto di un' azione tossica del colore. Egli crede perciò che si tratti realmente di formazioni preformate nella cellula. Oltre a ciò, egli ha osservato che nelle cellule, nelle quali in condizioni patologiche non è più possibile una colorazione vitale, diventa invece possibile la colorazione con quelle sostanze che hanno la proprietà di

tingere i lipoidi (colorazione sopravitale). Perciò egli viene alla conclusione che i granuli siano una combinazione di albumina e grasso, in cui l'involucro albuminoideo agisce come un colloide protettivo nel senso di *Bechhold*. Quando questo venga distrutto, la sostanza lipoide si rende libera. Si tratterebbe di un fatto analogo a quello, per cui sotto l'azione di una causa patologica (inanizione, avvelenamento da fosforo) i grassi del sangue da insolubili che erano diventano solubili nell'etere.

Non possiamo finire l' argomento della colorazione vitale senza accennare ad alcune idee di recente esposte da *Schulemann*. Secondo questo autore i granuli non sarebbero altro che una specie di corpo reattivo (*Reaktionskörper*) il quale si formerebbe nella cellula in seguito all' introduzione del colore, in qualche modo come all' introduzione di tossina segue la formazione di antitossina. Quest' opinione si fonda sopra alcuni esperimenti eseguiti combinando la colorazione vitale col Trypanblau e col Vitalneurot. Iniettando ai topi da principio una certa quantità di uno di questi colori, ed il giorno seguente la stessa quantità dell' altro, al terzo giorno si notava che il protoplasma di tutte le cellule colorabili, conteneva granuli rossi e granuli azzurri ad un tempo. Ciò parla per l'esistenza di reazioni chimiche, poichè altrimenti si sarebbero dovuti avere dei granuli violetti.

Infatti nelle fibre elastiche delle pareti vasali degli stessi animali, si notava precisamente una colorazione violetta; ciò perchè questa colorazione delle fibre elastiche era verosimilmente dovuto a fatti di *adsorbimento*. A questo esperimento si potrebbe muovere l' obbiezione che nel pericdo di un giorno si sono formati dei granuli nuovi e che quindi si tratta solo di adsorbimento; però si risponde facilmente a tale obbiezione col seguente esperimento: si iniettano contemporaneamente i due colori e si ottengono di nuovo granuli rossi e granuli azzurri, sicchè è lecita la supposizione che queste due specie di granuli siano di natura diversa. Oltre a ciò colorando gli animali solo con Vitalneurot o solo con Trypanblau, si osserva che col primo la colorazione vitale ha luogo molto più presto che col secondo. Ciò dipende dalla maggiore diffusibilità del Vitalneurot.

Iniettando contemporaneamente i due colori, si osserva che il

numero dei granuli rossi è diminuito di fronte ai preparati per combinazione col metodo in due tempi.

Da questi esperimenti non è difficile concludere che i granuli vengono formati solo dopo la penetrazione del colore nelle cellule e non sarebbero se non una combinazione chimica del colore con un ipotetico corpo reattivo. Questa ipotesi si fonda anche su altri fatti. Aumentando notevolmente il numero delle iniezioni di sostanza colorante, cresce soltanto il numero dei granuli e non l'intensità di colorazione dei singoli granuli. Verosimilmente fra una iniezione e l'altra si formano quantità sempre nuove del corpo reattivo che si combina col colore. Anche la forma dei granuli non è costante e sembra dipendere dalla velocità di diffusione del colore: quanto più lentamente questo diffonde, tanto più sottili ed uniformi divengono i granuli.

Per l'esistenza del corpo reattivo parla anche il fatto che vi sono cellule in cui il colore può penetrare nel protoplasma senza dar luogo a vera colorazione vitale sotto forma di granuli (cellule delle paratiroidi). Se un animale colorato vitalmente diviene gravido, la colorazione generale del corpo impallidisce ed il colore passa nell'utero: questo fatto si può spiegare ammettendo che il corpo reattivo vada disciolto e venga depositato di nuovo nell'utero. Il colore rimasto libero diffonde dalla cellula e si combina di nuovo al corpo reattivo. Se nelle cellule colorate vitalmente si formano dei veleni capaci di distruggere il corpo reattivo, questo si diffonde poi insieme col colore fuori della cellula. Secondo *Goldmann* come già accennammo, questo corpo sarebbe una combinazione debole di grasso e di albumina. Ciò spiegherebbe anche perchè non sia possibile ottenere *in vitro* una combinazione tra colore ed albumina sotto forma di granuli.

Dobbiamo infine accennare ad un argomento molto importante e cioè a quello delle così dette colorazioni metacromatiche.

In senso lato s'intende per metacromasia il cambiamento di una determinata tonalità di colore, divenendo essa differente da quella che il colore stesso aveva *in vitro*. Più comunemente, specie in istologia, si chiama così quel cambiamento di tonalità che il colore subisce nel preparato istologico per l'azione di un substrato che si

colora con esso, modificandone la tonalità. Ciò non tanto rispetto alla *nuance* che il colore ha *in vitro*, quanto rispetto a quella che ha assunto con lo stesso colore la maggior parte degli altri substrati presenti nel preparato. Per es. nel caso di colori basici serve da indice la tonalità che assumono i nuclei e noi designiamo come metacromatici quegli elementi che si tingono con tonalità differenti da questa fondamentale. Così nella colorazione della sostanza amiloide col violetto di metile, essa si tinge in violetto, quindi è metacromatica, mentre la tonalità fondamentale è data dal colore azzurro-violaceo dei nuclei cellulari.

La metacromasia si ha solo con l' uso di colori basici di anilina e solo su certi substrati di natura plastinica (granuli delle Mastzellen, granuli azzurrofili dei linfociti e dei leucociti linfoidi, alcune granulazioni degli eritrociti); dànno poi metacromasia anche alcune sostanze protoplasmatiche, come la mucina, la pseudomucina e l' amiloide. La sostanza nucleare dei protozoi è metacromatica in modo specifico solo per l' azur, ma ciò unicamente in presenza di colori acidi, i quali servono come da mordente.

La metacromasia si può avere anche *in vitro* per ragioni fisiche (colore differente dell'jodio sciolto in alcool ed in cloroformio) e chimiche. Questo fatto ha luogo per gli indicatori nelle analisi volumetriche giacchè gli acidi coloranti liberi (ematossilina, laccamuffa, orceina, fenolftaleina, acido rosolico), dànno metacromasia quando si trasformano in sali per l'aggiunta di alcali.

Fatti analoghi avvengono dissociando con l' aggiunta di acidi i sali coloranti acidi (reazioni della tropeolina e del rosso Congo con l' acido cloridrico). I colori basici si comportano in modo analogo, ma opposto; le basi libere si trasformano in sali variamente colorati; i sali monoacidi delle poliamine in colori di- e triacidi variamente colorati. Per es. il metilvioletto o monocloruro si trasforma in policloruro con un eccesso di acido cloridrico: analogamente avviene per il rosso neutro, la safranina, l' ametista. Finalmente trattando con alcali i colori basici salini essi vengono dissociati. Viene così messa in libertà la base carbinolica, per lo più meno colorata, la quale dà luogo alla metacromasia. Così la safranina, il rosso neutro, la pironina, l'akridinrot diventano più o meno gialli; il violetto di metile, la tionina, il bleu di toluidina, il cresylblau,

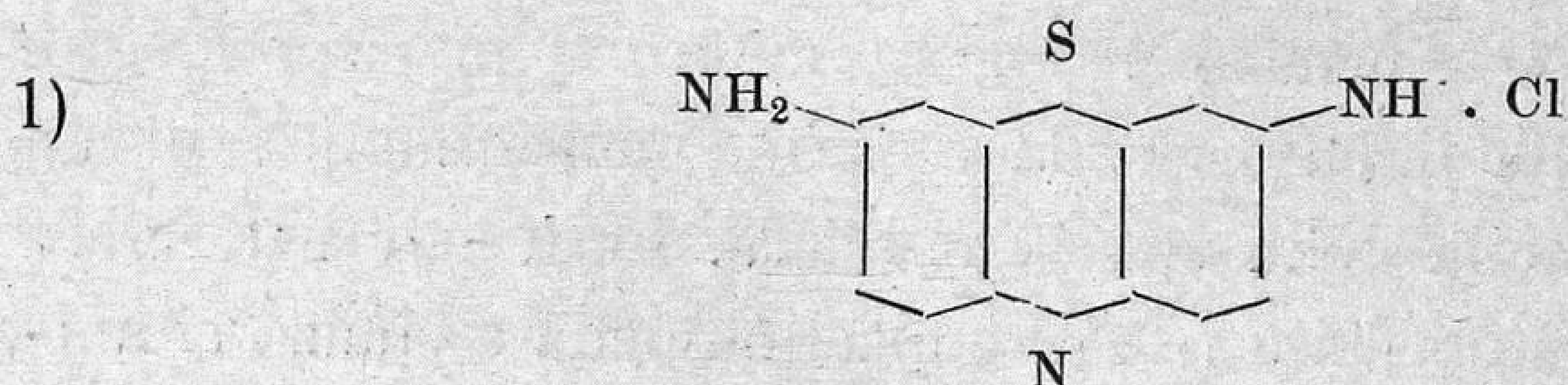
un poco anche l'azur diventano più o meno rossicci. Il substrato si colora con la base carbinolica libera, assumendola sotto forma di soluzione solida. La *nuance* del substrato colorato metacromaticamente corrisponde a quella della base carbinolica del colore posto in libertà dagli alcali e sciolto in cloroformio.

Michaelis dà una spiegazione un po' differente del processo della metacromasia. Anche per questo autore si può considerare come legge costante il fatto che la tonalità metacromatica di un colore basico è quella della sua base libera. Però egli non crede che col semplice fatto della reazione alcalina della sostanza cromotropa, si possa spiegare il processo metacromatico. Se così fosse, trattando con HCl le mastzellen colorate in rosso dalla tionina, esse dovrebbero tornare azzurre, giacchè si darebbe modo alla base della tionina di formare un sale. Oltre a ciò trattando il muco con tionina in soluzione acquosa esso si tinge in rosso, ma tale colorazione va perduta sotto l'azione dell'alcool che trasforma il color rosso in azzurro; trattando con acqua ricompare invece la tinta rossa, e questo gioco può essere ripetuto indefinitamente. Ciò dimostra che la trasformazione della varietà azzurra della tionina nella varietà rossa è un processo che ha luogo facilmente e senza gravi alterazioni del colore.

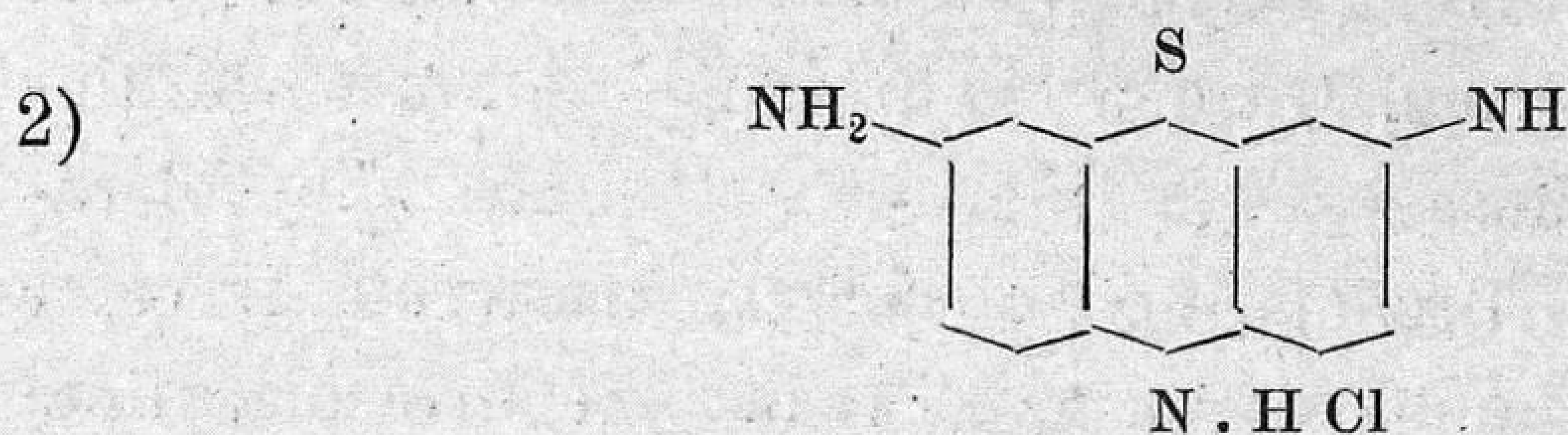
Riesce perciò assai ovvio ammettere che queste due varietà del colore non siano che composti tautomeri, i quali si possono far derivare facilmente l'uno dall'altro in quanto un atomo od un gruppo atomico cambia posto andando da un punto della molecola ad un altro. Verosimilmente, poichè il colore metacromatico è sempre quello della base libera, quel gruppo amidico che nella tionina azzurra è legato all'acido cloridrico, deve essere libero nella tionina rossa. Ma poichè l'acido non può essere scomparso, esso deve trovarsi in un altro punto della molecola, ed allora non rimane altro di libero se non l'atomo di azoto che sta dirimpetto a quello di zolfo e che cementa i due anelli benzolici. Noi possiamo chiamar quest'atomo *N centrale*, mentre gli altri due atomi appartenenti ai gruppi amidici, possiamo designarli come *N laterali*. Tutti i colori del gruppo delle indamine presentano questa particolare disposizione di tali gruppi. Dalle ricerche specialmente di *Nietzki*, risulta che sono azzurri quei colori indaminici, in cui la salificazione

avviene corrispondentemente ad uno dei due *N laterali*, mentre le basi libere di questi corpi sono rosse.

Viceversa sono rossi anche i sali di quei colori, in cui la salificazione avviene corrispondente all' *N centrale.* Per conseguenza noi potremo attribuire alla varietà azzurra della tionina la formula

1) 

ed alla varietà rossa alla formula

2) 

Non è poi possibile dire perchè la tionina sia sempre costituita secondo la formula 1°) quando è combinata al nucleo, e secondo la formula 2°) quando è combinata ai granuli delle mastzellen; però è altrettanto difficile di rispondere a questa questione come a quella del perchè il jodio appaia bruno in soluzione alcoolica, violetto in soluzione cloroformica.

Le granulazioni delle mastzellen sembrano derivare da trasformazione muco-lipoide della sostanza plastino-albuminoidea e da combinazioni lipoidi del protoplasma (albumino-lecitidi dello spongioplasma ?).

La sostanza basofila delle granulazioni mette in libertà come se fosse un alcali la base carbinolica rossa o gialla, e questa viene assorbita fisicamente sotto forma di soluzione solida dalla sostanza lipoide senza che si riformi il sale. Ciò avviene per un processo assolutamente uguale a quello che si ha, alcalinizzando *in vitro* il sale colorante ed agitando il tutto con cloroformio.

Occupano un posto a parte nelle dottrine della metacromasia, le sostanze azzurrofile, le quali non si possono tingere con gli altri

colori basici, anzi nè pure col verde di metile. Sono azzurrofili i nuclei dei protozoi ed i granuli secretori dei linfociti, dei mieloblasti, degli splenociti. L'azur è il meno metacromatico dei colori già citati, lo è più della fucsina e del bleu di metilene, giacchè colora le granulazioni metacromatiche degli eritrociti, come nella colorazione vitale, ma non colora invece la mucina ed i granuli delle Mastzellen.

La colorazione con l' azur però non ha luogo se non in presenza di sostanze coloranti acide. Il meccanismo di essa è differente da quello della comune metacromasia: non si tratta di un semplice assorbimento fisico della base colorante, ma di una combinazione chimica specifica sotto l' azione dell' acido.

Questo forma una triplice combinazione con le sostanze acide del tessuto colorato dall' azur, ed in parte anche avviva la *nuance* di questa combinazione.

L' azur presenta anche una leggera metacromasia non specifica per i nuclei dei leucociti, i quali si tingono in violetto. Quanto alle granulazioni colorate dall' azur nel protoplasma dei linfociti, esse si possono considerare come zone di secrezione e come prodotti lipoidi e mucosi del protoplasma albuminoideo. Tanto è vero che parecchi di questi granuli si colorano metacromaticamente a fresco col cresylblau e presentano allora una vera metacromasia (corpi di *Kurloff-Demel* nei mononucleati della cavia).

Bibliografia.

Ci limitiamo a citare le fonti principali da cui abbiamo tratto le pagine precedenti:

PAPPENHEIM, Grundriss der Farbstoffchemie. Berlin, Hirschwald, 1901.

MICHAELIS, Einführung in die Farbstoffchemie für Histologen. Berlin, Karger, 1902.

M. HEIDENHAIN, Plasma u. Zelle. Jena, Fischer, 1907.

PAPPENHEIM, Atlas der Menschlichen Blutzellen. Jena, Fischer, 1909-1910.

HÖBER. Physikalische Chemie der Zelle und der Gewebe. Leipzig, Engelmann, 1911.

GOLDMANN, Vitale Färbung und Chemoterapie. Berl. Klin. Wochenschr., n. 36, 1912.

GOLDMANN, Neue Untersuchungen über die äussere u. innere Sekretion des gesunden u. kranken Organismus im Lichte der « vitalen Färbung ». Tübingen, Laupp, 1912.

PAPPENHEIM u. NAKANO, Beiträge über Beziehungen zwischen Vitalfärbung. Supravitalfärbung und Oxydasereaktion. Folia haemat., Januar 1913.



FIRENZE

SOCIETÀ TIPOGRAFICA FIORENTINA

33 - VIA S. GALLO - 33

1913